

Implementação da nomenclatura ICAP no Serviço de Imunologia do Centro Hospitalar e Universitário do Porto

Rui Marcelo Viana Martins Gomes

Mestrado em Biologia Molecular e Celular

Departamento de Biologia

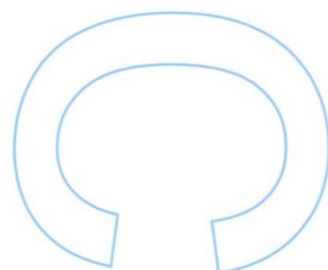
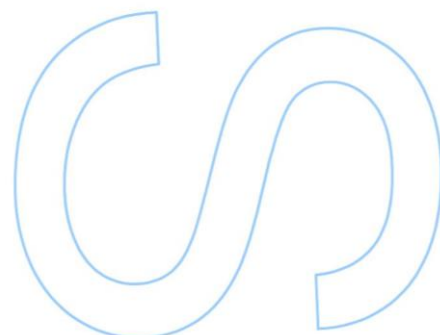
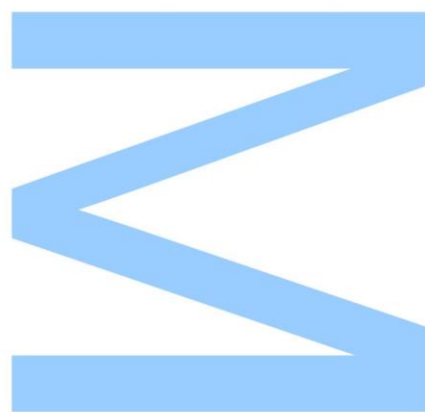
Ano letivo: 2018/2019

Orientador

Maria Otília Figueiras, assessora da carreira Farmacêutica no CHUP

Coorientador

Maria Susana Pereira, Professor associado na FCUP



Agradecimentos

Concluir o mestrado em Biologia Celular e Molecular numa faculdade de renome como é o caso da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, era para mim um sonho desde tenra idade. Foram 19 anos a lutar para isto e é com grande satisfação que, depois de todo este tempo, termino esta importante etapa da minha vida.

Neste momento, entendo que é a altura de endereçar o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que deram o seu contributo para este projeto.

Em primeiro lugar, à minha orientadora a Dra. Otília Figueiras, assim como a todos os profissionais do Serviço de Imunologia do Centro Hospitalar e Universitário do Porto, por todo o apoio dado durante a realização deste projeto, fornecendo-me a mim, além de todo o tempo dispensado, o seu vasto conhecimento e experiência nesta área.

À minha coorientadora a Professora Maria Susana Pereira por todo o seu apoio e experiência que sem dúvida fizeram a diferença na realização desta dissertação.

Aos meus pais, por serem pessoas excecionais, por me incutirem valores que fazem de mim o homem que sou hoje e me terem dado o seu apoio incondicional em todos os momentos bons e maus momentos durante estes 2 anos de mestrado. Sem vocês isto teria sido impossível, por isso um grande obrigado.

Às minhas irmãs por todo o carinho que me oferecem todos os dias.

Aos meus avós, por tudo aquilo que me ensinaram com a sua experiência de vida.

A todas as minhas tias por todo o apoio que me deram cada uma à sua maneira e dentro das vossas possibilidades e conhecimentos.

Finalmente, aos meus amigos por todos os bons momentos que me proporcionaram.

Resumo

O método de pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) por Imunofluorescência Indireta (IFI), usando como substrato células HEp-2, é amplamente utilizado no diagnóstico de Doenças Autoimunes (DAI), desde a década de 70 do século XX. No entanto, a classificação dos padrões de fluorescência observados carecia de uma nomenclatura que uniformizasse e organizasse em grupos os padrões, de forma a simplificar quer a identificação em cada laboratório quer para facilitar através de uma linguagem universal a interpretação dos resultados por parte dos clínicos.

Com vista à resolução deste problema foram realizados no Brasil uma série de congressos, o primeiro destes em 2000, com o intuito de se concretizar a criação de uma nomenclatura que uniformizasse a classificação dos padrões de fluorescência, assim como investigar a relevância clínica dos mesmos e criar medidas de controlo de qualidade. No seguimento destes congressos de dimensão nacional foi criado em 2014 o *International Consensus on ANA Patterns* (ICAP), um consenso com dimensão internacional para a criação de uma nomenclatura universal para os padrões de fluorescência observados em células HEp-2. Neste primeiro congresso, adotou-se uma nomenclatura que continha 28 padrões de fluorescência agrupados em 3 grupos de padrões (nucleares, citoplasmáticos e mitóticos). No segundo congresso em 2016 foi desenvolvido um website para facilitar a divulgação e a consulta da nomenclatura, assim como a criação de mais dois padrões: AC-29 e AC-0 (negativo).

Com vista a acompanhar toda a evolução científica ocorrida nesta área, o Serviço de Imunologia (SI) do Centro Hospitalar e Universitário do Porto (CHUP) decidiu adotar a nomenclatura ICAP na sua rotina laboratorial. Assim, como consequência do estágio curricular que se realizou no SI do CHUP entre setembro de 2018 e junho de 2019 foi elaborada a presente dissertação de mestrado, tendo como base a nomenclatura ICAP.

Palavras chave: doenças autoimunes, imunofluorescência indireta (IFI), células HEp-2, padrões de fluorescência, anticorpos antinucleares (ANA), anti-cell (AC) e consenso ICAP.

Abstract

The antinuclear antibody (ANA) screening in HEp-2 cells using Indirect Immunofluorescence (IFI) method has been widely used in the diagnosis of Autoimmune Diseases (DAI) since the 1970s. However, the classification of observed fluorescence patterns lacked a nomenclature that uniformized and organized the observed patterns into groups, in order to simplify both laboratory identification and to allow clinician's interpretation of results by an universal language.

To help solving this problem, a series of congresses were held in Brazil, the first being held in 2000, in order to achieve the creation of a standardize nomenclature that would serve as a nomenclature of fluorescence patterns, as well as to investigate their clinical relevance and create quality control measures. Following these nationwide congresses, the International Consensus on ANA Patterns (ICAP) was created in 2014, a consensus with an international dimension for the creation of a universal nomenclature for fluorescence patterns observed in HEp-2 cells. In this first congress, a nomenclature was adopted containing 28 fluorescence patterns grouped into 3 pattern groups (nuclear, cytoplasmic and mitotic). In a second congress held in 2016, a website was developed to ease the dissemination and consultation of the nomenclature, as well as the creation of two more patterns: AC-29 and AC-0 (negative).

In order to follow all scientific developments in this area, the Immunology Service (SI) of the Centro Hospitalar e Universitário do Porto (CHUP) decided to adopt the ICAP nomenclature in its laboratory routine. Thus, as a consequence of the curricular internship done at SI of CHUP between September 2018 and June 2019, the present Master's dissertation was elaborated based on the ICAP nomenclature.

Keywords: autoimmune diseases, indirect immunofluorescence (IFI), HEp-2 cells, fluorescence patterns, antinuclear antibodies (ANA), anti-cell (AC), ICAP consensus.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Lista de imagens.....	1
Lista de abreviaturas.....	4
Estado da arte	7
Doenças autoimunes	10
Imunofluorescência Indireta	12
Células HEp-2.....	16
Nomenclatura ICAP	17
Nucleares.....	18
Citoplasmáticos.....	28
Mitóticos.....	35
Prosseguimento do estudo analítico	38
Normas ICAP para reportar resultados	39
Como o SI vai reportar os resultados.....	41
Conclusão.....	44
Bibliografia.....	45

Lista de imagens

Figura 1: Primeiro algoritmo de classificação de padrões nucleares, citoplasmáticos e mitóticos em células HEp-2 por IFI. Adaptado de www.anapatterns.org.

Figura 2: Atual algoritmo de classificação ICAP para padrões de fluorescência em células HEp-2. (adaptado de www.anapatterns.org)

Figura 3: Equipamento Quanta Lyser 3000 usado no SI do CHUP

Figura 4: Equipamento Nova View usado no SI do CHUP

Figura 5: Negativo (AC-0). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 6: Algoritmo de classificação dos padrões nucleares. Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 7: Padrão Nuclear Homogêneo (AC-1). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 8: Padrão Nuclear Mosqueado Fino Denso (AC-2). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 9: Padrão Nuclear Mosqueado Fino (AC-4). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 10: Padrão Nuclear Mosqueado Grosseiro (AC-5). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 11: Padrão Nuclear Granular (Tipo Topoisomerase I/ Scl-70) (AC-29). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 12: Padrão Nuclear Centrômero (AC-3). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 13: Padrão Nuclear Múltiplos Pontos Nucleares (AC-6). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 14: Padrão Nuclear Raros Pontos Nucleares (AC-7). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 15: Padrão Nuclear Nucleolar Homogêneo (AC-8). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 16: Padrão Nuclear Nucleolar Aglomerado (AC-9). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 17: Padrão Nuclear Nucleolar Pontado (AC-10). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 18: Padrão Nuclear Membrana Nuclear Linear (AC-11). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 19: Padrão Nuclear Membrana Nuclear Ponteada (Complexo Poro Nuclear) (AC-12). Adaptado de: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 20: Padrão Nuclear Pleomórfico (Tipo PCNA) (AC-13). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 21: Padrão Nuclear Pleomórfico (Tipo CENP-F) (AC14). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 22: Algoritmo de classificação dos padrões citoplasmáticos. Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 23: Padrão Citoplasmático Filamentoso Linear (AC-15). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 24: Padrão Citoplasmático Filamentoso Fibrilar (AC-16). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 25: Padrão Citoplasmático Filamentoso Segmentar (AC-17). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 26: Padrão Citoplasmático Granular (Grânulos Isolados) (AC-18). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 27: Padrão Citoplasmático Granular Fino Denso (AC-19). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 28: Padrão Citoplasmático Granular Fino (AC20). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 29: Padrão Citoplasmático Reticular (Tipo Mitocondrial) (AC-21). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 30: Padrão Citoplasmático Granular Polar (Tipo Golgi) (AC-22). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 31: Padrão Citoplasmático Anéis e Bastonetes (AC-23). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Figura 32: Algoritmo de classificação dos padrões mitóticos. Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 33: Padrão Centrossoma (AC-24). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 34: Padrão Fuso Mitótico (AC-25). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 35: Padrão Fuso Mitótico (NuMA-1) (AC-26). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 36: Padrão Ponte Intercelular (AC-27). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 37: Padrão Envelope Cromossômico (AC-28). Adaptado de: www.anapatterns.org

Figura 38: Quatro resultados possíveis reportados à luz das duas propostas em discussão.

Figura 39: Relatório de paciente do sexo masculino de 61 anos.

Figura 40: Relatório de paciente do sexo masculino de 44 anos.

Figura 41: Relatório de paciente do sexo feminino de 14 anos.

Figura 42: Relatório de paciente do sexo feminino de 48 anos.

Figura 43: Relatório de paciente do sexo feminino de 60 anos.

Figura 44: Relatório de paciente do sexo masculino de 69 anos.

Lista de abreviaturas

AC: Anti-cell;

ACR: American College of Rheumatology

AMA: Anticorpos anti-mitocôndria;

ANA: Anticorpos anti-nucleares;

AR: Artrite reumatóide;

CBP: Colangite biliar primária;

DAI: Doenças autoimunes;

DFS 70: Dense fine speckled;

DMTC: Doença mista do tecido conjuntivo;

DNA: Ácido desoxirribonucleico;

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay;

EM: Esclerose múltipla;

ES: Esclerose sistêmica;

FEIA: Fluorimetric enzyme immunoassay;

FIRMA: Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Mallattie Autoimmuni

FITC: Isotiocianato de fluoresceína;

HEp-2: Células epiteliais humanas;

IB: Immunoblotting;

ICAP: International consensus on ANA patterns;

IFI: Imunofluorescência indireta;

IUIS: International Union of Immunological Societies

LED: Lúpus eritematoso discoide;

LES: Lúpus eritematoso sistêmico;

LLC: Leucemia linfocítica crônica;

LNS: Lúpus neonatal subcutâneo;

MAI: Miopatia autoimune;

MO: Microscópio ótico;

SAF: Síndrome antifosfolípídico;

SS: Síndrome de Sjogren;

VHC: Virús hepatite C;

Estado da arte

O método de pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) por Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizando como substrato células HEp-2 tem sido abundantemente utilizado desde os anos 70 do século passado na pesquisa de autoanticorpos causadores de doenças autoimunes. No entanto, a ausência de uma nomenclatura de referência que fosse utilizada internacionalmente pelos diferentes laboratórios de forma a uniformizar a leitura e interpretação clínica dos padrões de fluorescência observados era um grande *handicap* deste método, limitando assim o diagnóstico de doenças autoimunes (DAI).^{1,2} O primeiro passo para a criação de uma nomenclatura que uniformizasse este processo foi dado em agosto de 2000 em Goiânia, Brasil, num congresso em que resultou o I consenso Brasileiro para a pesquisa de autoanticorpos.² Neste congresso, discutiu-se a falta de critérios padronizados de leitura, a falta de organização dos padrões de imunofluorescência e ainda a inexistência de uma nomenclatura universal para os referidos padrões.² No II congresso realizado em 2003, concretizou-se a criação de grupos de padrões de fluorescência (nucleares, aparelho mitótico, citoplasmáticos e mistos) e a respetiva relevância clínica para cada um deles.^{1,2} O III congresso foi realizado em 2007 e teve como principais preocupações o desenvolvimento dos trabalhos, realizados no II congresso, relacionados com a relevância clínica de cada padrão e de cada grupo, avaliar a implementação das normas de padronização que resultaram dos congressos anteriores e, por fim, a criação de medidas de controlo de qualidade para todo o processo.¹ Também foram definidas novas terminologias para os padrões de imunofluorescência mistos, discutida a definição de positividade do núcleo e apresentados estudos com vista à entrada de novos padrões de imunofluorescência.² Em setembro de 2012, foi realizado o IV congresso resultando 10 novas recomendações sobre a caracterização dos padrões de imunofluorescência, o controlo de qualidade, o procedimento técnico e ainda métodos alternativos.¹ As medidas que foram criadas neste congresso contribuíram, essencialmente, para o aperfeiçoamento dos critérios do controlo de qualidade.²

Em 2014, durante o décimo segundo International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity em São Paulo no Brasil, foi criado o ICAP (International Consensus on ANA Patterns) com o objetivo de uniformizar a nomenclatura e a interpretação dos padrões de imunofluorescência observados em células HEp-2, de forma a otimizar o seu uso no diagnóstico de doenças autoimunes.^{3,4} Neste primeiro congresso, implementou-se uma nomenclatura que compreende 28 padrões de fluorescência divididos em 3 grupos (14 padrões nucleares, 9 padrões citoplasmáticos e 5 padrões

mitóticos).⁵ Foi também decidido que todos os padrões teriam no nome a abreviatura “AC”. A abreviatura “AC” significa “anti-cell” e foi escolhida com o intuito de englobar os 3 grupos enumerados anteriormente.^{3,4,6}

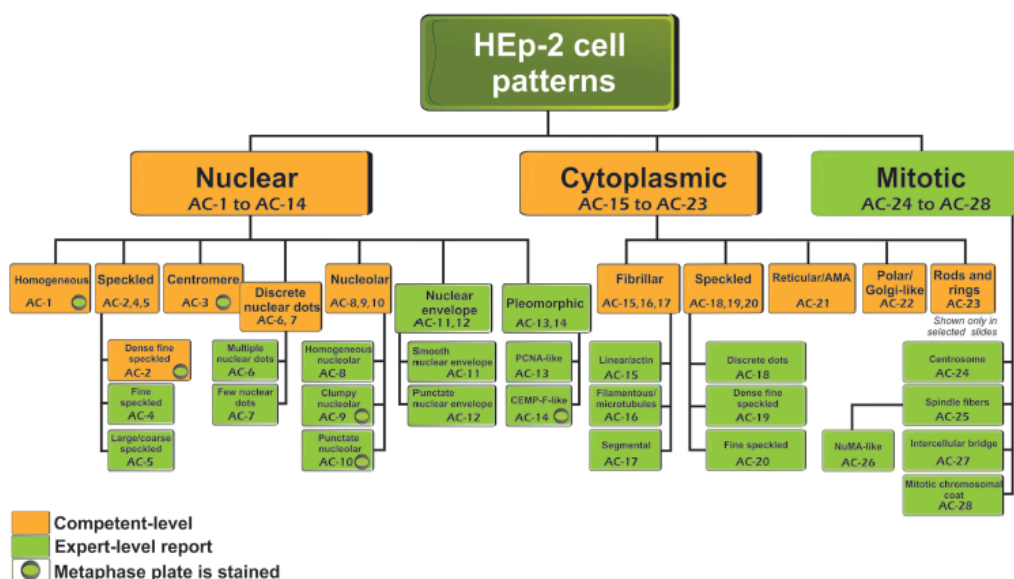


Figura 1: Primeiro algoritmo de classificação de padrões nucleares, citoplasmáticos e mitóticos em células HEp-2 por IFI. Adaptado de www.anapatterns.org.

O V congresso foi realizado em 2016 em Dresden e teve como principais temas a posição dos padrões de fluorescência citoplasmáticos e mitóticos na classificação e a relevância clínica de alguns padrões de imunofluorescência (anticorpos envolvidos e doenças associadas).^{3,4} Foi também desenvolvido um website (www.anapatterns.com) onde podem ser visualizados todos os padrões de imunofluorescência agrupados nos respectivos grupos, o código associado ao padrão (AC-1 a AC-28) e ainda imagens e descrição de cada padrão.³ Por fim, foram aprovadas as diretrizes para a inclusão de novos padrões de fluorescência no futuro próximo.⁴

Mais recentemente, foram incluídos no sistema de classificação ICAP mais 2 padrões de fluorescência: o padrão Negativo (AC-0): ausência de padrão observado e AC-29: padrão nuclear.^{5,7} A nova árvore de classificação dos padrões de fluorescência está ilustrada na figura seguinte.

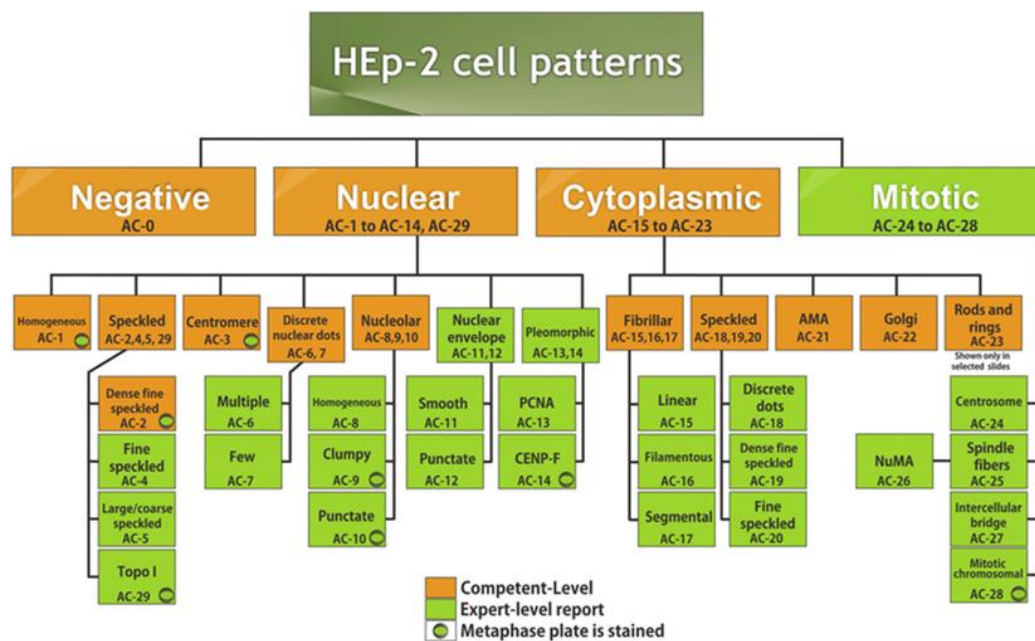


Figura 2: Atual algoritmo de classificação ICAP para padrões de fluorescência em células HEp-2. (adaptado de www.anapatterns.org)

O relato do padrão observado depende do nível de competência do laboratório. Como se pode observar no esquema da figura 2, existem dois níveis de competência: o nível competente (básico) e o nível *expert* (avançado).⁶ No nível competente, os observadores apenas reportam os padrões de fácil reconhecimento, ao passo que, no nível *expert* os observadores reportam todos os padrões presentes na nomenclatura ICAP. Assim, dividiu-se os padrões nos respectivos níveis de competência com base em dois fatores: relevância clínica e facilidade no reconhecimento do padrão.⁶

O objetivo deste trabalho é a implementação da nomenclatura ICAP no Serviço de Imunologia (SI) do Centro Hospitalar e Universitário do Porto (CHUP). O SI resolveu adotar esta nomenclatura de forma a uniformizar a classificação dos padrões de fluorescência e, assim, acompanhar a evolução científica que se tem feito nesta área a nível mundial.

Doenças autoimunes

O termo doenças autoimunes (DAI) compreende um largo espectro de doenças relacionadas com a desregulação do sistema imunitário em que ocorre um erro na tolerância imunológica ao self.⁸⁻¹⁰ As DAI são um grupo de doenças que aglomeram várias etiologias (muitas ainda desconhecidas), sintomas clínicos, idades e etnias. Embora o conceito de autoimunidade tenha sido pela primeira vez descrito por Paul Ehrlich no início do século XX, apenas em meados deste século, através da identificação dos primeiros autoanticorpos, as DAI foram mais valorizadas em contexto clínico.^{8,10,11} As DAI durante muito tempo foram consideradas situações raras, no entanto, atualmente, estima-se que as DAI afetem cerca de 5 a 7% da população ocidental, o que faz destas umas das mais frequentes doenças no mundo, apenas superadas pelos carcinomas e pelas doenças cardiovasculares.^{11,12} As DAI afetam indivíduos de todas as idades e, embora possa afetar ambos os sexos, as doenças autoimunes têm principal incidência no sexo feminino.¹¹ Ainda que as DAI afetem indivíduos de todas as raças, algumas são mais prevalentes em determinadas raças do que noutras. Quanto à evolução da prevalência destas na população mundial, apesar de não haver ainda uma causa explicativa, a prevalência destas doenças têm vindo a aumentar muito significativamente ao longo dos últimos anos, causando um enorme impacto social e económico nos sistemas de saúde.^{12,13}

As DAI são essencialmente patologias de origem inflamatória crónica, envolvem mecanismos de lesão tecidual por via de processos humorais e celulares. Estes processos poderão ter origem em fatores hormonais, genéticos, ambientais ou ainda idiopáticos. Em suma, o processo patológico destas doenças centra-se, essencialmente, na reação de autoanticorpos do indivíduo contra o self, ou seja, contra estruturas do próprio organismo.^{9,13}

As DAI podem ainda ser específicas de órgão ou sistémicas. Nas DAI específicas de órgão, a resposta autoimune é limitada apenas a um determinado órgão, sendo exemplo destas doenças, a doença de Graves, a doença de Addison, a diabetes tipo 1, a colangite biliar primária (CBP), a anemia autoimune, entre outras.¹⁴ Nas DAI sistémicas, a resposta imune envolve vários órgãos, tomando uma dimensão verdadeiramente sistémica, afetando vários sistemas do corpo humano em separado ou em conjunto. A esclerose sistémica (ES), a artrite reumatoide (AR), o síndrome de Sjögren ou ainda o lúpus eritematoso sistémico (LES), entre outros, são exemplos de DAI sistémicas. No total, estão descritas mais de 100 DAI.^{13,15}

Embora as DAI sejam bastante heterogêneas, estas também partilham entre si algumas semelhanças etiológicas, patogénicas e epidemiológicas.¹³ Uma destas semelhanças é o facto de as DAI serem frequentes em doentes do sexo feminino em idade reprodutiva. Calcula-se que este grupo tenha 2,7 vezes mais probabilidade de desenvolver uma DAI do que os homens.^{16,17} No caso de outras doenças como o LES ou a CBP, o ratio entre homens e mulheres que desenvolvem estas patologias é de 9 mulheres para 1 homem.¹³ Ainda que não haja uma explicação consensual no mundo científico para este facto, pensa-se que as hormonas femininas afetas à reprodução, à inativação do cromossoma X e o microquimerismo fetal estejam entre as causas possíveis para a maior incidência em mulheres em idade reprodutiva.^{16,17}

Recentemente, estudos de genética comprovaram através do estudo do genoma de gémeos monozigóticos, em que um destes não desenvolvia a doença, a importância de fatores ambientais, tais como infeções, alimentação ou ingestão de xenobióticos no desenvolvimento de DAI. Apesar dos esforços que se têm feito nos últimos anos, os fatores etiológicos das DAI, assim como, a sua patogénese permanecem desconhecidos.¹⁰

Imunofluorescência Indireta

A IFI é uma técnica largamente utilizada em contexto laboratorial para a detecção de autoanticorpos em DAI. Foi pela primeira vez utilizada na detecção de ANA em 1950 e é visto como o método *gold standard* para a pesquisa deste tipo de anticorpos pelo *American College of Rheumatology*.^{2,18,19} A técnica de IFI consiste em adicionar uma amostra de soro ou plasma do paciente a um substrato, neste caso células HEp-2, e pesquisar a fixação de anticorpos sobre as estruturas celulares por aplicação de uma anti-imunoglobulina humana marcada com um fluorocromo, neste caso FITC (Isotiocianato de fluoresceína).²⁰ Durante os últimos anos, esta técnica foi aperfeiçoada de forma a aumentar a sua sensibilidade, embora com o prejuízo de ter diminuído a sua especificidade.²⁰ O FITC é um fluoróforo, derivado da fluoresceína que produz fluorescência quando excitado por um feixe de luz com 480 nm. A radiação emitida tem como comprimento de onda 530 nm, é de cor verde e pode ser observada com recurso a um microscópio de epifluorescência. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra e, posteriormente, é semiquantificada através de um título.²¹

Apesar de a técnica de IFI ser uma técnica que fornece resultados muito fiáveis, existem fatores que podem afetar a fiabilidade dos seus resultados bem como a reprodutibilidade dos mesmos. Estes fatores podem ser agrupados em três categorias:²²

- Fatores biológicos: relacionados com os reagentes. Estes fatores podem afetar a expressão antigénica, sensibilidade e a especificidade do método. São exemplos destes fatores: as linhas celulares HEp-2 utilizadas e as condições de cultura das referidas células;
- Fatores procedimentais: relacionados com o analisador e o operador. Estes fatores afetam a reprodutibilidade e a sensibilidade do método. Como exemplos de fatores procedimentais que podem afetar a fiabilidade do método pode-se referir: as amostras utilizadas, o processamento (Manual vs Automático), o microscópio utilizado e o *cut-off* utilizado;
- Fatores de decisão: relacionados com a decisão do operador perante o resultado observado. Estes fatores podem diminuir a reprodutibilidade, aumentar o tempo e o custo da realização do método. Assim, podem ser referidos como fatores de decisão que afetam a fiabilidade do método os seguintes: a diluição inicial, a nomenclatura, os relatórios e as *guidelines* utilizadas.

No SI do CHUP, a pesquisa de ANA pelo método de IFI é realizada no equipamento Quanta-Lyser 3000 da casa comercial Inova Diagnostics. A leitura das amostras é feita no equipamento Nova View da mesma casa comercial. Neste processo os dois equipamentos funcionam de forma integrada. O microscópio utilizado para a observação das células após a realização deste método, quando necessário, é o microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse 80i.

O Quanta Lyser 3000 é um equipamento existente no SI do CHUP totalmente automático capaz de realizar as técnicas de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e de IFI. As suas principais vantagens são a grande rapidez de execução, o que permite uma maior economia de tempo, e a redução dos custos operacionais, nomeadamente em termos de materiais utilizados na realização das técnicas. Pelo facto de ser um equipamento automático permite também a produção de resultados fiáveis e de maior rastreabilidade dos mesmos. Este equipamento tem a capacidade máxima de 240 amostras por carga e, por ser um equipamento já adaptado de fábrica para funcionar de forma integrada com o equipamento Nova View, as lâminas que resultam do processamento deste equipamento podem ser transferidas diretamente para o Nova View sem necessidade da adição de lamela.

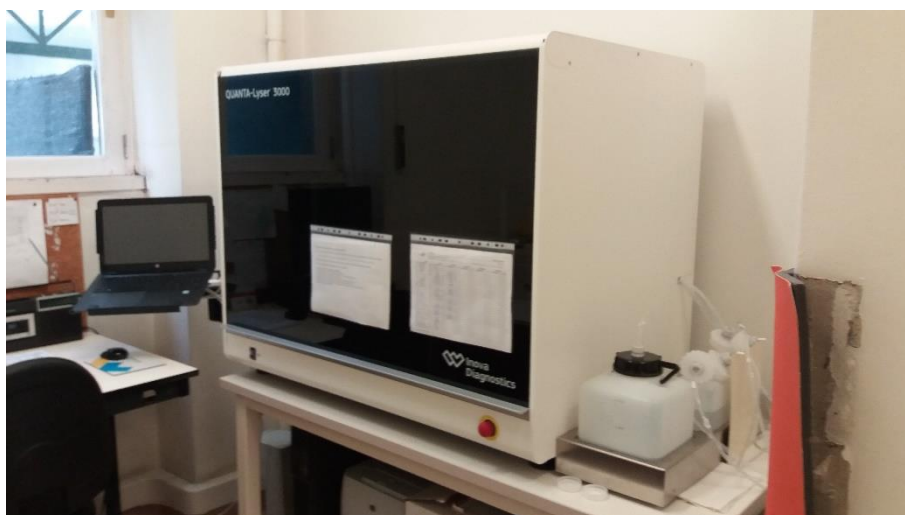


Figura 3: Equipamento Quanta Lyser 3000 usado no SI do CHUP

O Nova View é um equipamento de leitura de lâminas, constituído por um microscópio de fluorescência e um *software* informático que realiza a captura e armazenamento de imagens digitais das lâminas de células HEp-2. Este equipamento

também atribuí classificações quanto aos padrões de fluorescência, no entanto, apenas consegue identificar cinco padrões nucleares: Mosqueado, Homogéneo, Nucleolar, Múltiplos Pontos Nucleares e Centrômero. Posteriormente, as imagens captadas e as respetivas classificações atribuídas por este equipamento são visualizadas, analisadas e confirmadas por um operador que, quando necessário, também faz observação ao MO.



Figura 4: Equipamento Nova View usado no SI do CHUP

Para a pesquisa de ANA foi utilizado no SI do CHUP um kit da casa comercial Inova Diagnostics com a referência 704320. Este kit contém os seguintes componentes:

- Lâminas HEp-2 de 12 poços;
- Conjugado anti-IgG FITC com DAPI contendo 0.9% de azida sódica;
- Controlo Positivo padrão titulável: soro com anticorpos anti núcleo das células HEp-2 contendo 0.9% de azida sódica;
- Controlo Negativo: soro sem anticorpos contendo 0.9% de azida sódica;
- PBS concentrado em 40X: diluente e tampão de lavagem;
- Meio de montagem com 0.9% de azida sódica;
- Lamelas.

O SI do CHUP participa em programas de controlo de qualidade externo, como por exemplo, o External Quality Assessment Services (NEQAS). O NEQAS é um dos mais credenciados programas internacionais de avaliação externa sediado no Reino Unido, cujo objetivo é oferecer uma avaliação imparcial e independente do desempenho numa ampla gama de testes para laboratórios. O NEQAS envia de dois em dois meses

amostras com concentração conhecida do analito a pesquisar. Cada laboratório analisa e envia os seus resultados. Posteriormente, o NEQAS envia um relatório comparativo com os resultados por analito, por método e por casa comercial de todos os laboratórios que participaram naquele programa. Caso o resultado não seja conforme, é criado um incidente online em que o laboratório identifica o erro e propõe ações corretivas apropriadas ao tipo de erro que originou o resultado não conforme de forma a prevenir a ocorrência do mesmo erro no futuro.^{23,24}

Células HEp-2

As células HEp-2 são uma linha celular originárias de um carcinoma epidermal da laringe de um homem de 56 anos.²⁵ As células HEp-2 apresentam uma morfologia epitelial devido à sua origem, crescendo com forte aderência a superfícies de forma indefinida.²⁵ Por serem de origem humana, os antígenos possuem maior especificidade em relação às células de rato, sendo o seu núcleo de maiores dimensões em relação a estas últimas.²⁶ Por terem origem num carcinoma, têm elevada atividade mitótica, o que aumenta a especificidade do teste permitindo observar células em vários estádios do ciclo celular, aumentando o número de antígenos expostos.²⁷ Têm ainda elevada sensibilidade o que permite a deteção de diferentes anticorpos contra diferentes antígenos na mesma amostra em simultâneo.²⁶ Apresentam um largo espectro de deteção, entre 100 a 150 autoanticorpos permitindo a identificação dos 29 padrões ICAP.^{2,18,19,28} Por tudo isto, o método de Imunofluorescência Indireta usando como substrato células HEp-2 é considerado pelo American College of Rheumatology como método *gold standard* para a pesquisa de ANA.²⁶ Como limitações, pode-se referir o facto de esta técnica exigir observadores altamente treinados e a subjetividade da observação.²⁹

Como foi referido anteriormente, as células HEp-2 são o substrato de excelência por possuírem elevada sensibilidade, permitindo uma avaliação qualitativa (positivo/negativo) e ainda uma avaliação semi-quantitativa (no caso de ser positivo, o título associado à diluição mais elevada da amostra onde foi observado o padrão).²⁷ No entanto, este substrato possui uma baixa especificidade, pelo facto de alguns dos padrões de fluorescência observados não serem específicos para um único anticorpo.²⁷ Por outro lado, amostras com vários tipos de anticorpos podem originar padrões de fluorescência mistos.²⁷

A diluição *screening* para a pesquisa de ANA é de 1:160 em pacientes adultos e 1:80 em pacientes com idade inferior a 16 anos. No caso de ser positivo, e em função da intensidade de fluorescência, prossegue-se o estudo fazendo diluições seriadas 1:320, 1:640 e por fim 1:1280 por esta ordem. A diluição mais elevada onde é detetada fluorescência é o título do anticorpo observado.¹³

A identificação dos anticorpos associados aos diferentes padrões de fluorescência é feita por técnicas complementares: FEIA (fluorimetric enzyme immunoassay), ELISA, IB (ImmunoBlotting) e CLIA (Quimioluminescência) a fim de proceder à sua correta identificação e quantificação.¹³

Nomenclatura ICAP

O algoritmo de classificação inclui 3 grupos de padrões: nucleares, citoplasmáticos e mitóticos.^{30,31} No mesmo nível de decisão, mas fora destes grupos, existem também o padrão AC-0 e o padrão AC-XX.³

A nomenclatura usada neste trabalho, resultou de um consenso nacional que incluiu os maiores laboratórios públicos e privados do nosso país. Esta nomenclatura não é mais do que uma tradução da nomenclatura ICAP em que nada se mudou no que diz respeito aos grupos e subgrupos de padrões. As mudanças limitam-se aos nomes dos padrões que foram traduzidos do Inglês original para a língua portuguesa usada no nosso país.

O padrão Negativo (AC-0) aparece no algoritmo de classificação ICAP no mesmo nível das outras 3 categorias (nuclear, citoplasmático e mitótico) pelo facto de a primeira decisão a tomar ser se a amostra é positiva ou negativa.⁵ Este padrão representa o resultado a sair para o clínico quando não há visualização de fluorescência nuclear, citoplasmática ou mitótica ou quando a fluorescência observada é de intensidade inferior ao *cut-off*. Apesar de não haver um consenso para o valor de *cut-off* a utilizar, estudos recentes têm recomendado que cada laboratório defina o seu *cut-off*, usando como ferramenta populações controlo de forma experimental.⁵ O *cut-off* pode ser influenciado pelo substrato HEp-2 usado por cada laboratório, assim como, outros fatores como o fluorocromo utilizado, ou mesmo o microscópio.⁵

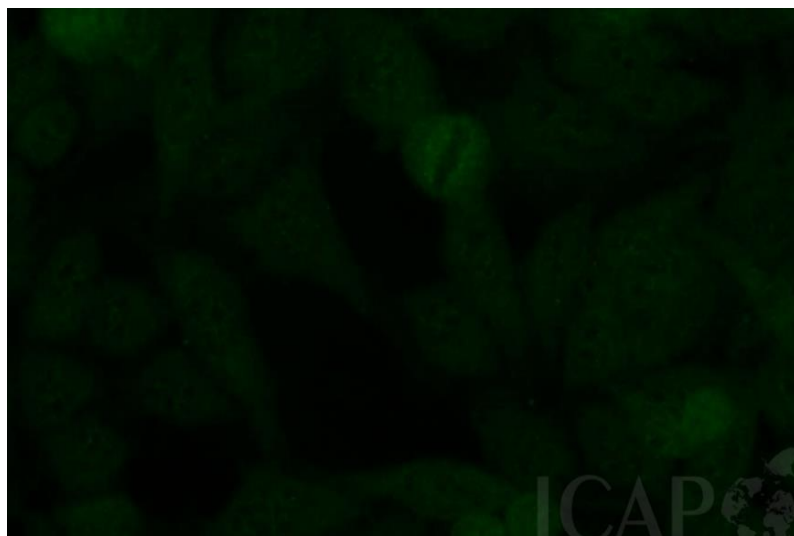


Figura 5: Negativo (AC-0). Adaptado de www.anapatterns.org

No caso de se observar um padrão celular que não se enquadra em nenhum padrão já existente na nomenclatura ICAP, esse padrão é denominado por AC XX e é reportado acompanhado de uma descrição do padrão observado.⁷ Assim, o padrão AC-XX permite a comunicação de padrões ainda não abrangidos na nomenclatura ICAP. Este padrão representa uma solução temporária que engloba todos os padrões ainda não classificados pela nomenclatura ICAP, contudo, num futuro próximo, espera-se que os padrões aqui contidos sejam agrupados noutros AC que se espera que sejam criados.⁵

A introdução dos padrões AC-0 e AC-XX permite que a nomenclatura ICAP abranja todos os possíveis padrões observados.⁵

Nucleares

O padrões nucleares representam um total de 7 subgrupos que incluem 15 padrões (AC-1 a AC-14 e AC-29).

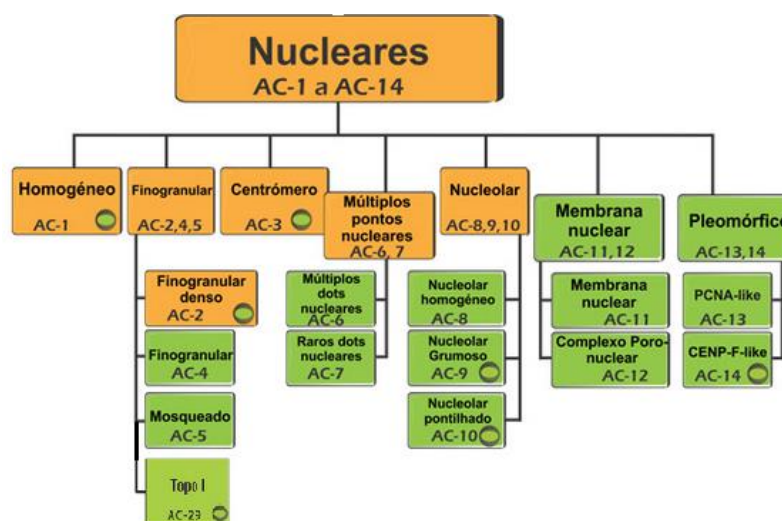


Figura 6: Algoritmo de classificação dos padrões nucleares. Adaptado de www.anapatterns.org

Destes apenas o AC-29 foi descrito posteriormente ao primeiro consenso ICAP.⁷ Assim, os padrões nucleares até agora descritos são:

- **Padrão Nuclear Homogêneo (AC-1):** fluorescência uniforme em toda o nucleoplasma não sendo possível distinguir o nucléolo, células em mitose positivas apresentando placas metafásicas cromossômicas intensamente coradas.³²

Associado a antígenos tais como: nucleossomas, dsDNA e histonas, pode ser encontrado em pacientes com SLE, artrite idiopática juvenil, Lúpus induzido por drogas ou hepatite crônica autoimune. Apesar de o padrão AC-1 ser o mais frequente em pacientes com hepatite crônica autoimune, por vezes, pacientes com esta doença podem exibir outros padrões;³⁰

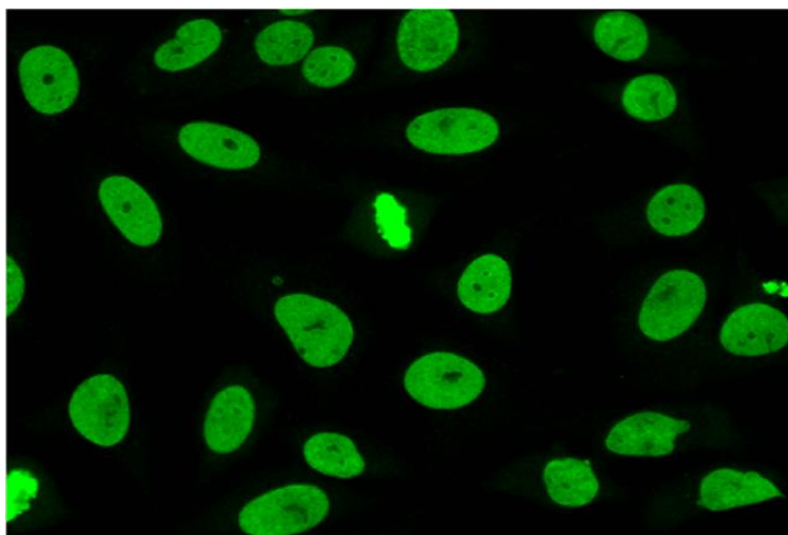


Figura 7: Padrão Nuclear Homogêneo (AC-1). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Padrões Nucleares Mosqueados: AC-2,4,5 e 29

- Padrão Nuclear Mosqueado Fino Denso (AC-2): este padrão é caracterizado por um grande número de pontos de vários tamanhos ao longo de todo o núcleo da células em interfase. Estes pontos podem apresentar diferente distribuição ao longo do núcleo. As células em mitose são positivas.³²

Este padrão é associado ao antígeno DFS70.³⁰ Estes anticorpos, inicialmente, foram identificados em pacientes com cistite intersticial, no entanto, atualmente, este padrão também tem sido observado em pacientes aparentemente saudáveis e mais raramente em pacientes com Síndrome de Sjogren (SS), Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) ou Esclerose Múltipla (EM).³³

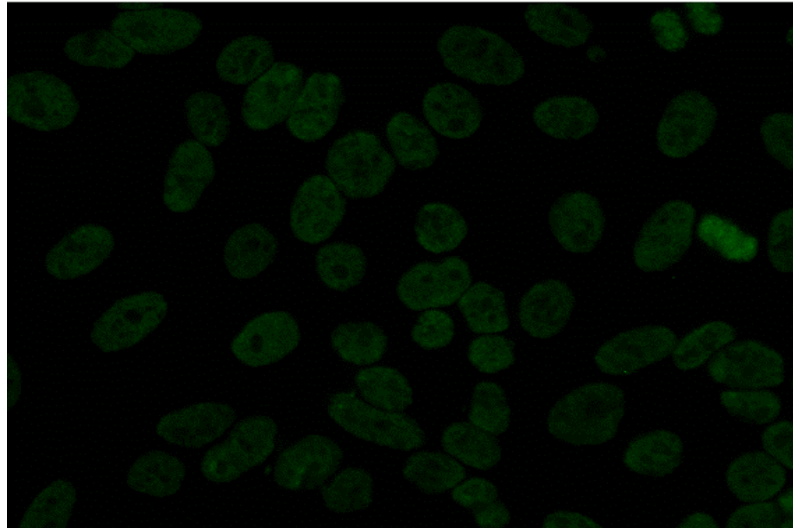


Figura 8: Padrão Nuclear Mosqueado Fino Denso (AC-2). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- Padrão Nuclear Mosqueado Fino (AC-4): pequenos, mas numerosos grânulos finos ao longo do nucleoplasma. Nas células em mitose a cromatina não aparece corada.³²

Os antígenos mais frequentemente associados a este padrão são: SS-A/Ro, Mi-2, SS-B/La e TIF1. Este padrão está presente em pacientes com SS, LES, entre outros.³⁰

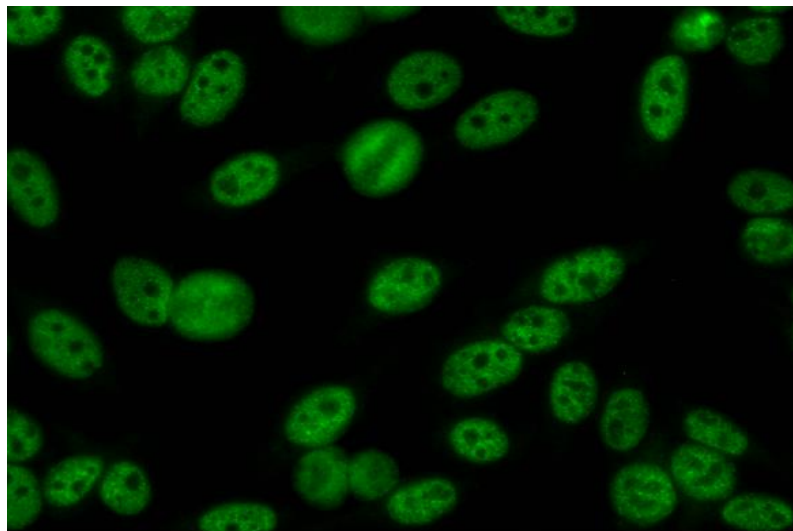


Figura 9: Padrão Nuclear Mosqueado Fino (AC-4). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- Padrão Nuclear Mosqueado Grossoiro (AC-5): grandes grânulos espalhados por todo o nucleoplasma. Tal como no padrão anterior, nas células em mitose a cromatina não se apresenta corada.³²

Presente em DAI muito distintas tais como: LES, SSc, Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC), está associado aos antígenos Sm, hnRNP, U1RNP, RNA polimerase III. Por vezes, observa-se a presença deste padrão em pacientes sem DAI identificada.³⁰

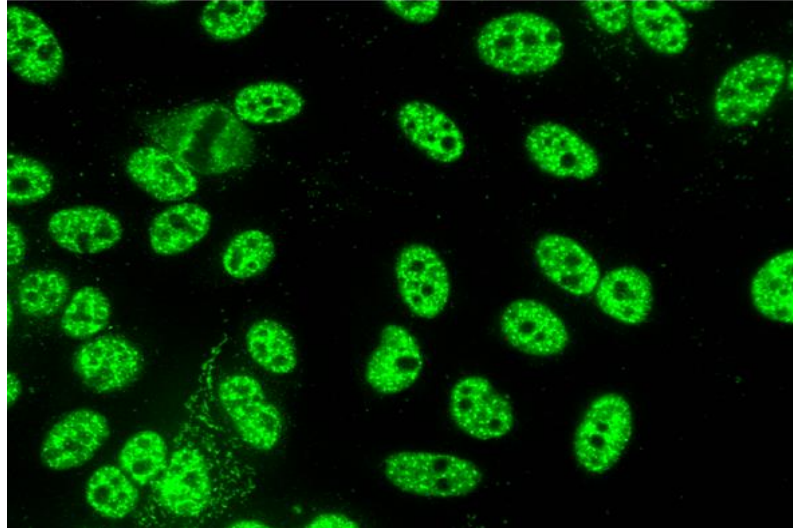


Figura 10: Padrão Nuclear Mosqueado Grosseiro (AC-5). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- Padrão Nuclear Granular (tipo Topoisomerase I/ Scl-70) (AC-29): este padrão pode-se manifestar pela marcação de 5 zonas subcelulares:³²

- Coloração fina e pontuado nas células em interfase (semelhante ao padrão AC-4);
- Coloração forte na zona da cromatina em células em mitose. Esta coloração, caso a diluição do soro usada seja baixa, pode inclusivamente dar o aspeto de ser homogénea;
- Coloração forte da região associada do nucléolo devido aos cromossomas que existem nessa zona celular.
- Coloração fraca do citoplasma da célula em interfase em forma de rede que parte da zona perinuclear e acaba na membrana plasmática;
- Coloração nuclear variável nas células em interfase em forma de pontuado que tanto pode estar presente no núcleo como na zona perinucleolar

O padrão AC-29 é altamente específico para a SSc, em particular para as formas mais agressivas desta DAI.³⁰

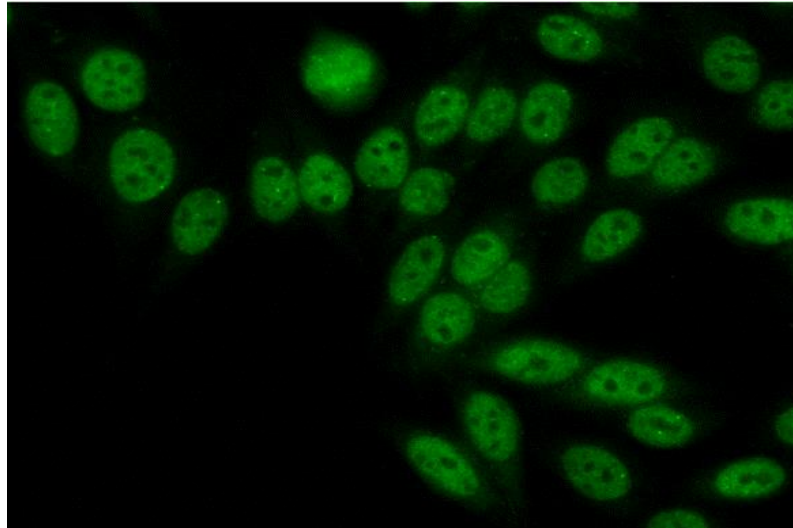


Figura 11: Padrão Nuclear Granular (Tipo Topoisomerase I/Scl-70) (AC-29). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- **Padrão Nuclear Centrômero** (AC-3): numerosos pontos (40 a 80) fluorescentes no nucleoplasma das células em interfase. Nucléolos negativos. As células em mitose positivas apresentam os mesmos pontos observados nas células em interfase concentrados na placa metafásica.³²

Frequentemente encontrado em pacientes com SSc, sendo que, por vezes esses pacientes apresentam SSc e síndrome de Raynaud ou SSc com CBP. Quando em títulos altos podem estar associados a anticorpos anti CENP-A/B;³⁰

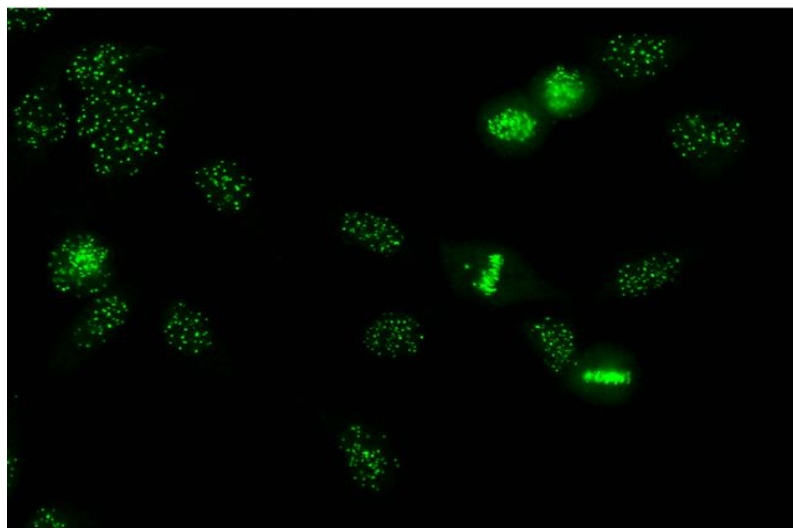


Figura 12: Padrão Nuclear Centrômero (AC-3). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- **Padrão Nuclear Múltiplos Pontos nucleares (AC-6):** entre 6 a 20 pontos nucleares no nucleoplasma com nucléolos negativos. Células em mitose negativas.³²

O padrão AC-6 está associado aos antígenos Sp-100, proteínas PML, MJ/NXP-2. É largamente encontrado em pacientes com doenças autoimunes muito variadas tais como: CBP, doenças autoimunes reumáticas sistêmicas, Dermatomiosite e doenças inflamatórias;³⁰

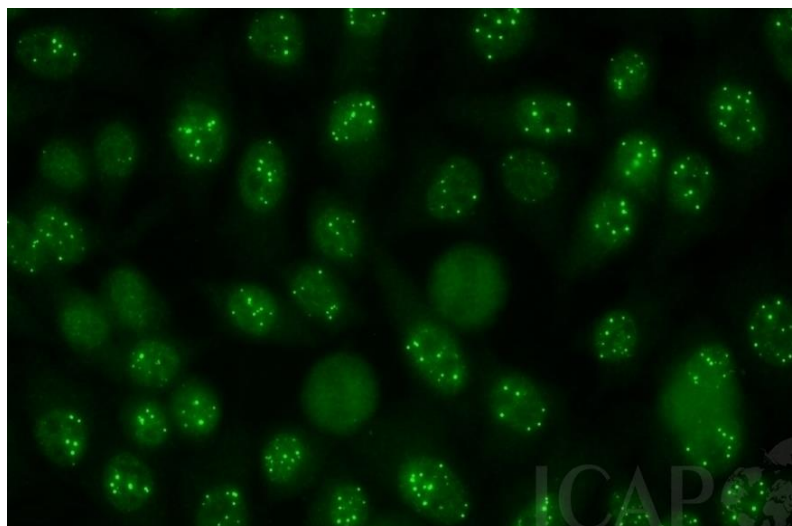


Figura 13: Padrão Nuclear Múltiplos Pontos Nucleares (AC-6). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- **Padrão Nuclear Raros Pontos Nucleares (AC-7):** entre 2 a 6 pontos nucleares no nucleoplasma denominados corpos de Cajal. As células em mitose não apresentam marcação.³²

O padrão AC-7 apresenta baixo valor preditivo para DAI. Os antígenos relacionados com este padrão são o antígeno p80-coilin e o complexo SMN.³⁰

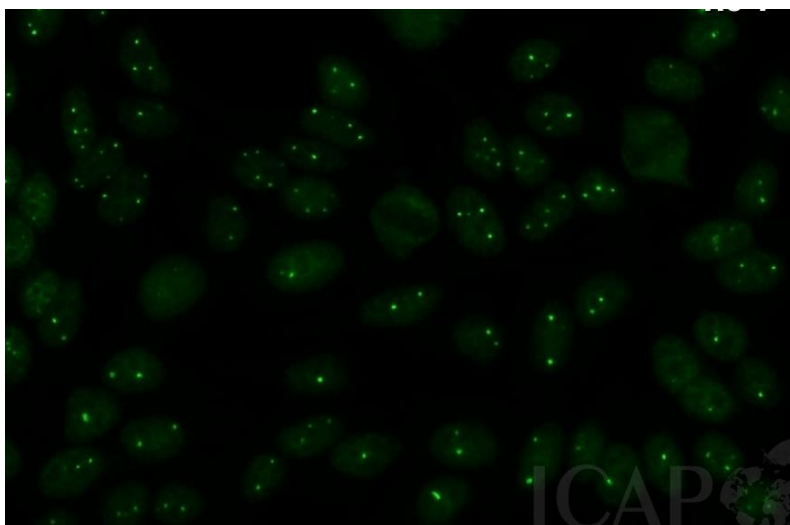


Figura 14: Padrão Nuclear Raros Pontos Nucleares (AC-7). Adaptado de: www.anapatterns.org

Padrões Nucleares Nucleolares: AC-8, 9 e 10

- Padrão Nuclear Nucleolar Homogêneo (AC-8): este padrão é caracterizado por uma fluorescência difusa e uniforme sem grânulos em todo o nucleoplasma. As células em mitose não apresentam qualquer marcação.³²

Encontrado essencialmente em pacientes com SSc, também pode estar associado a sobreposição de SSc e Polimiosite. O padrão AC-8 também pode estar associado a outros antígenos tais como: o PM-Scl75, PM-Scl100, Th/To, B23/nucleophosmin, No55/SC65, e o C23/nucleolin.³⁰

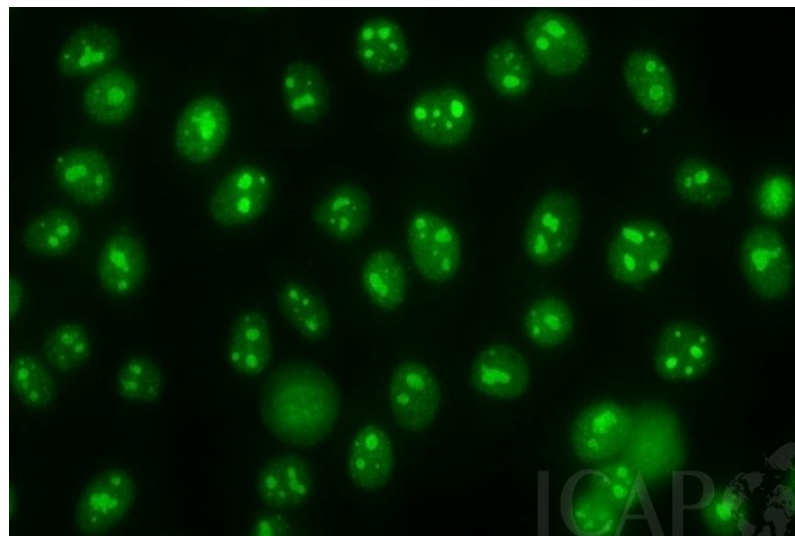


Figura 15: Padrão Nuclear Nucleolar Homogêneo (AC-8). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Nuclear Nucleolar Aglomerado (AC-9): este padrão é caracterizado por uma marcação irregular dos nucléolos no nucleoplasma. Nas células em mitose existe uma marcação peri-cromossômica nas placas metafásicas.³²

Este padrão pode ser encontrado em pacientes com SSc. Quando se suspeita de SSc, é recomendado fazer confirmação através da pesquisa de anticorpos anti-U3RNP/fibrilharina.³⁰

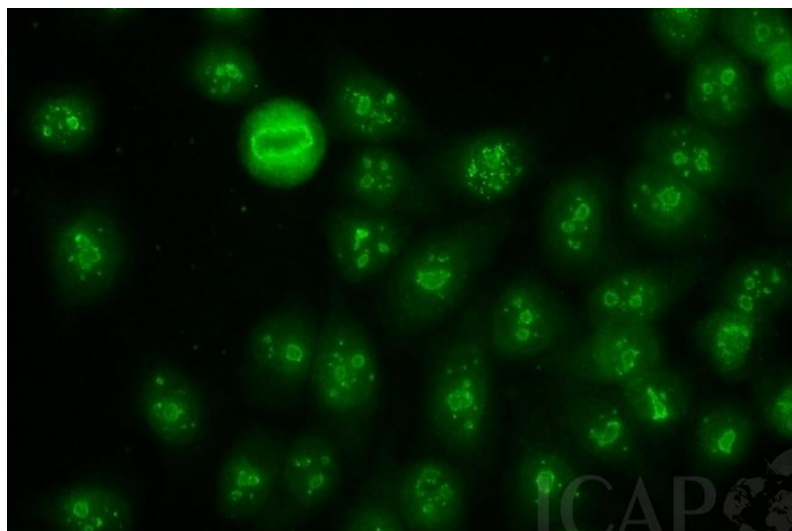


Figura 16: Padrão Nuclear Nucleolar Aglomerado (AC-9). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Nuclear Nucleolar Ponteadado (AC-10): a principal característica do padrão AC-10 é o facto de exibir os nucléolos das células em interfase com aspeto pontilhado. As células em metáfase, costumam exibir até 5 pares de pontos brilhantes na região dos nucléolos, o citoplasma destas células pode apresentar alguma positividade.³²

O padrão AC-10 pode ser observado em amostras provenientes de pacientes com várias DAI. São exemplos destas DAI a SSc, Síndrome de Raynaud's ou o SS. É aconselhado prosseguir o estudo com a pesquisa de anticorpos anti-NOR90(hUBF) ou RNA Polimerase I.³⁰

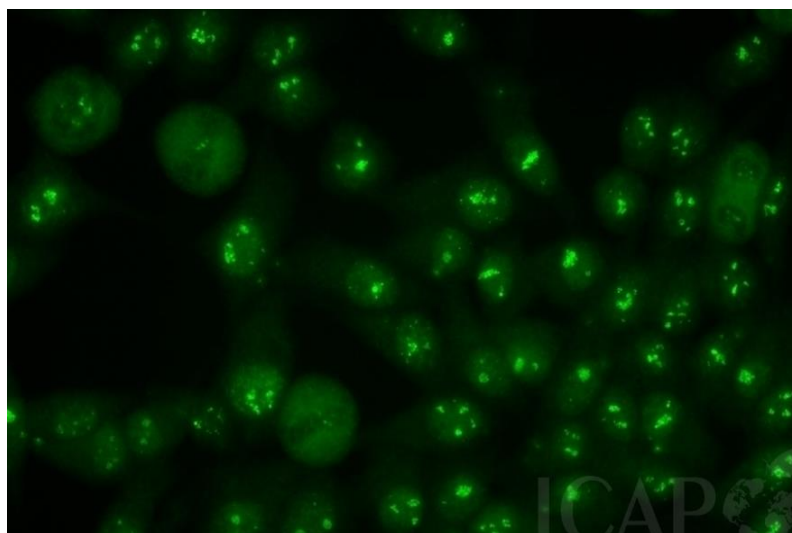


Figura 17: Padrão Nuclear Nucleolar Ponteadado (AC-10). Adaptado de: www.anapatterns.org

Padrões Nucleares Membrana Nuclear: AC-11 e 12

- Padrão Nuclear Membrana Nuclear Linear (AC-11): neste padrão pode-se observar a coloração homogênea do núcleo com particular intensidade da membrana nuclear. Observa-se também a acentuação da intensidade da fluorescência nos locais de ligação entre as células. Nas células em metáfase não se observa marcação na placa cromossômica.³²

O padrão AC-11 apesar de ser raro de se encontrar na rotina laboratorial, tem sido descrito em citopenias autoimunes, doenças hepáticas autoimunes, esclerodermia e Síndrome antifosfolípido (SAF). Os antígenos associados a este padrão são: laminas A,B e C.³⁰

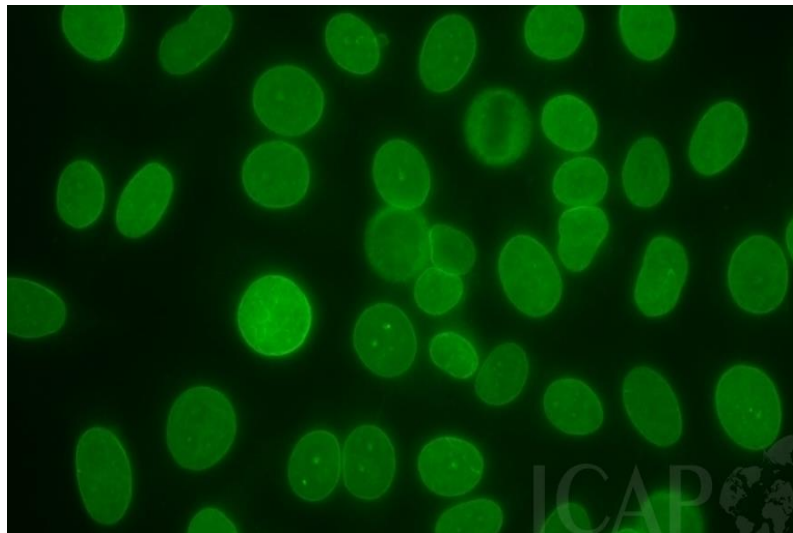


Figura 18: Padrão Nuclear Membrana Nuclear Linear (AC-11). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Nuclear Membrana Nuclear Ponteada (Complexo Poro Nuclear) (AC-12): neste padrão, o envelope nuclear das células em interfase apresenta uma fluorescência descontínua, com ligeiro aumento da fluorescência nos pontos de contacto entre células. Nas células em mitose não se verifica marcação na placa metafásica.³²

O referido padrão pode ser encontrado em pacientes com CBP e em doentes com doença hepática autoimune. Em caso de suspeita de CBP é recomendada a pesquisa do anticorpo anti-GP210. Outros anticorpos tais como o p62 nucleoporina, LBR e o TPR também já foram associados a este padrão.³⁰

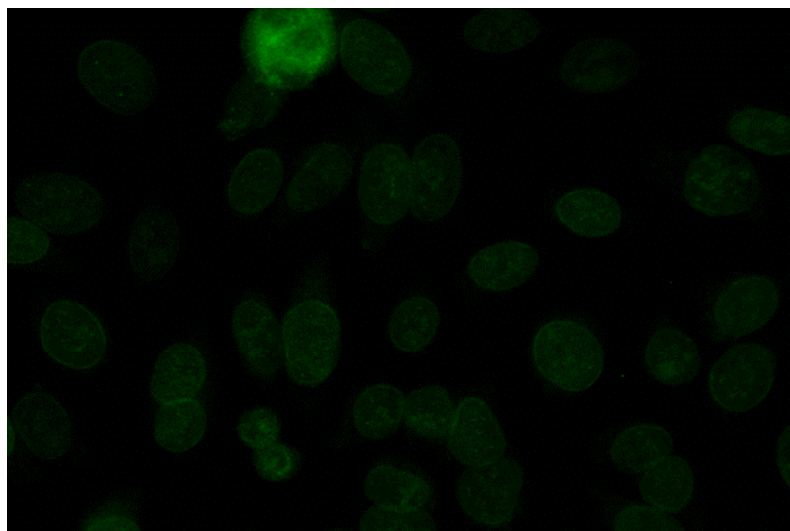


Figura 19: Padrão Nuclear Membrana Nuclear Ponteadada (AC-12). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Padrões Nucleares Pleomórficos: AC-13 e 14

- Padrão Nuclear Pleomórfico (Tipo PCNA) (AC-13): fluorescência granular com diferentes intensidades e diferentes tamanhos em células em interfase. Nas células em interfase, algumas são positivas (na fase S), ao passo que, outras são negativas (fase G1). Os nucléolos são negativos assim como as células em mitose.³²

É altamente específico para o SLE. No entanto, também tem sido associado em estudos recentes a outras doenças tais como: SSc, Hepatite C (VHC), AR, Miopatia Autoimune (MAI), entre outras. É associado ao antígeno PCNA;³⁰

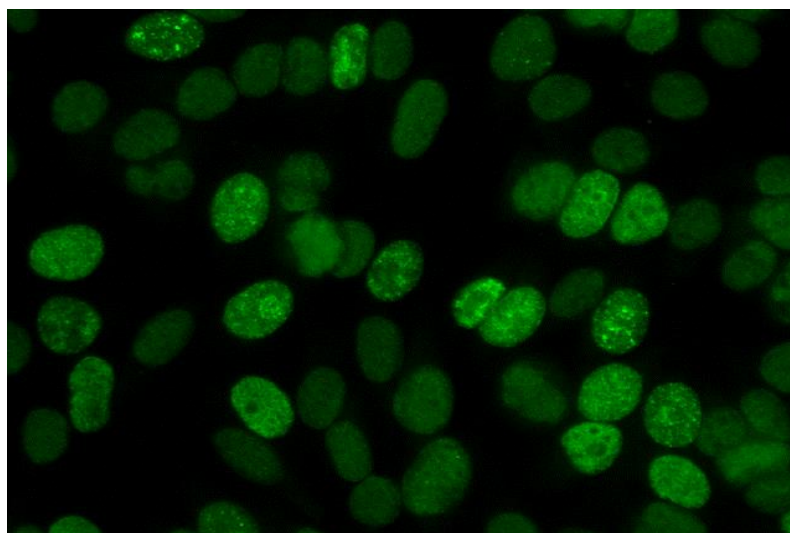


Figura 20: Padrão Nuclear Pleomórfico (Tipo PCNA) (AC-13). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- Padrão Nuclear Pleomórfico (Tipo CENP-F) (AC-14): neste padrão podem ser observados células em interfase com núcleos que possuem grânulos com grande variabilidade na intensidade da fluorescência (desde fraca na fase G1 a intensa na fase G2). Nas células em metáfase, os centrômeros são positivos exibindo múltiplos, mas discretos, pontos alinhados, enquanto que o citoplasma é corado de forma difusa.³²

Estudos recentes têm associado o AC-14 a neoplasias não malignas, em particular neoplasias da mama, pulmão ou colon, e a condições inflamatórias tais com a doença de Crohn, SS e a doença hepática autoimune. O antígeno mais associado a este padrão é o antígeno CENP-F.³⁰

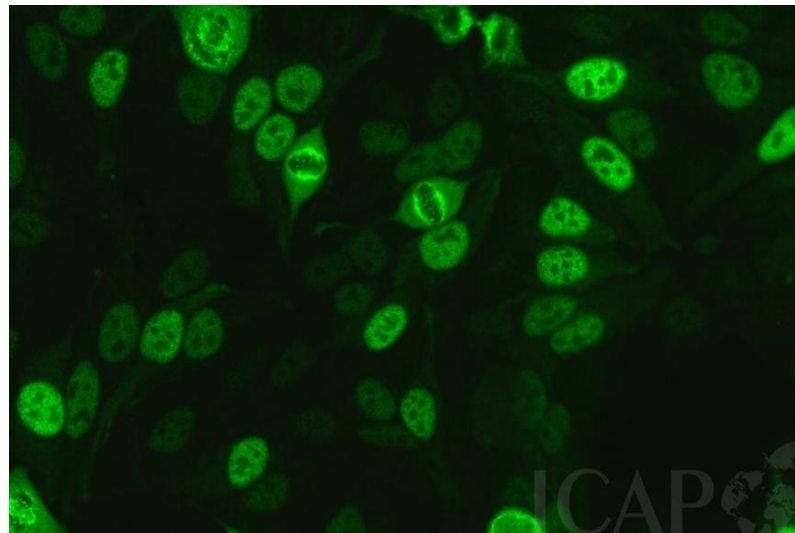


Figura 21: Padrão Nuclear Pleomórfico (Tipo CENP-F) (AC14). Adaptado de: www.anapatterns.org

Citoplasmáticos

Os 9 padrões citoplasmáticos já descritos encontram-se distribuídos em 5 subgrupos (AC-15 a AC-23) sendo o segundo mais numeroso grupo de padrões do sistema ICAP.³⁰

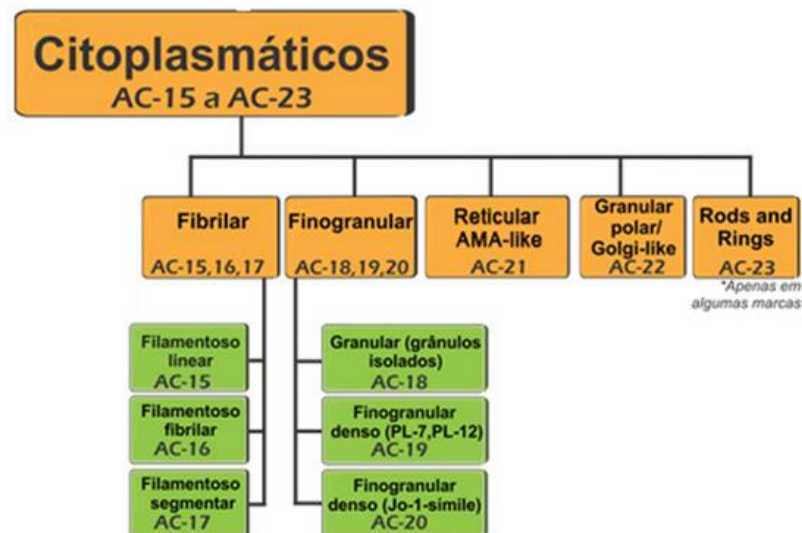


Figura 22: Algoritmo de classificação dos padrões citoplasmáticos. Adaptado de: www.anapatterns.org

Padrões Citoplasmáticos Filamentosos: AC-15,16 e 17

- Padrão Citoplasmático Filamentoso Linear AC-15: o padrão AC-15 é identificado pela marcação das fibras do citoesqueleto acompanhadas, ocasionalmente, de depósitos granulares pequenos e descontínuos. Pode ainda observar-se uma fluorescência dos filamentos estriados de actina.³²

O padrão AC-15 é comumente associado a pacientes com AHI tipo 1, doença celíaca ou infecção crônica por HCV. Os anticorpos mais frequentemente associados a este padrão são: anti-actina e anti-miosina.³⁰

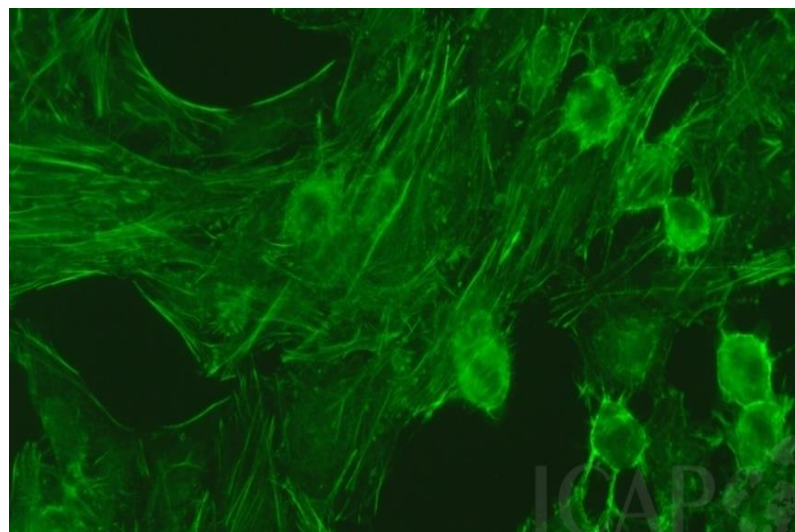


Figura 23: Padrão Citoplasmático Filamentoso Linear (AC-15). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Citoplasmático Filamentoso Fibrilar (AC-16): neste padrão observa-se a marcação dos microtúbulos e filamentos intermediários com fluorescência. A fluorescência é mais visível junto à membrana nuclear.³²

O padrão AC-16 pode ser encontrado em pacientes portadores de várias doenças, mas não em pacientes portadores de doenças reumáticas sistêmicas. Os antígenos associados a este padrão são: citoqueratinas 8, 18 e 19, tubulina, e vimentina.³⁰

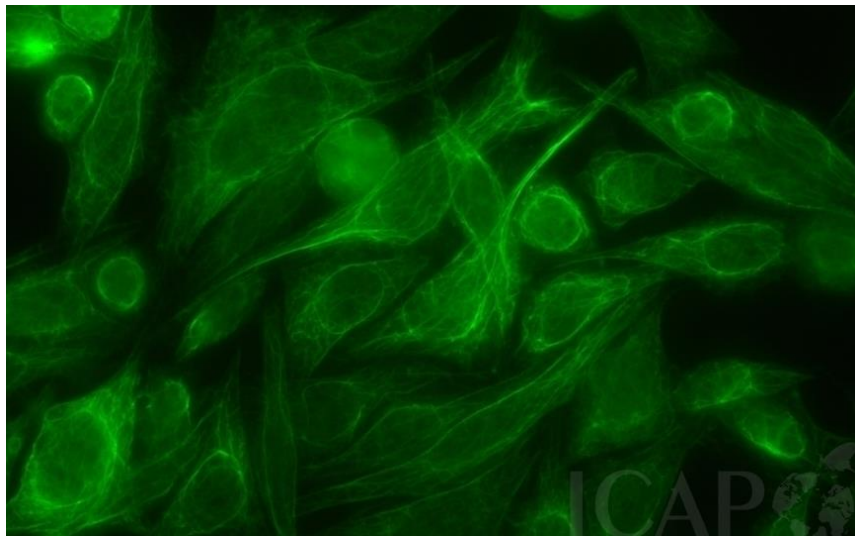


Figura 24: Padrão Citoplasmático Filamentoso Fibrilar (AC-16). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Citoplasmático Filamentoso Segmentar (AC-17): padrão caracterizado por marcação característica de curtos filamentos citoplasmáticos ao longo das fibras de stress.³²

O padrão AC-17 está associado aos antígenos alfa-Actina e Vinculina e é muito raramente encontrado na rotina laboratorial. Pela sua importância clínica reduzida não se encontram disponíveis no mercado kits para a detecção dos anticorpos encontrados neste padrão.³⁰

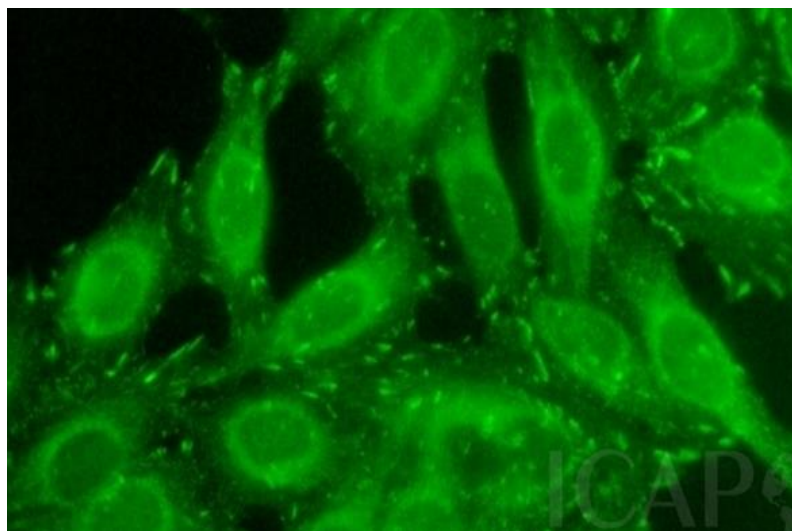


Figura 25: Padrão Citoplasmático Filamentoso Segmentar (AC-17). Adaptado de: www.anapatterns.org

AC-18, 19 e 20 Padrões Citoplasmáticos Granulares

- Padrão Citoplasmático Granular (grânulos isolados) (AC-18): neste padrão observa-se a marcação dos GW bodies no citoplasma das células em interfase, principalmente nas células em G2.³²

O padrão AC-18 é frequentemente reportado não só em pacientes portadores de doenças reumáticas sistêmicas, mas também em pacientes com outras doenças muito variadas. Os antígenos associados a este padrão são: Ge-1/Hedls, GW182, EEA1, CLIP-170, GRASP-1 e LBPA;³⁰

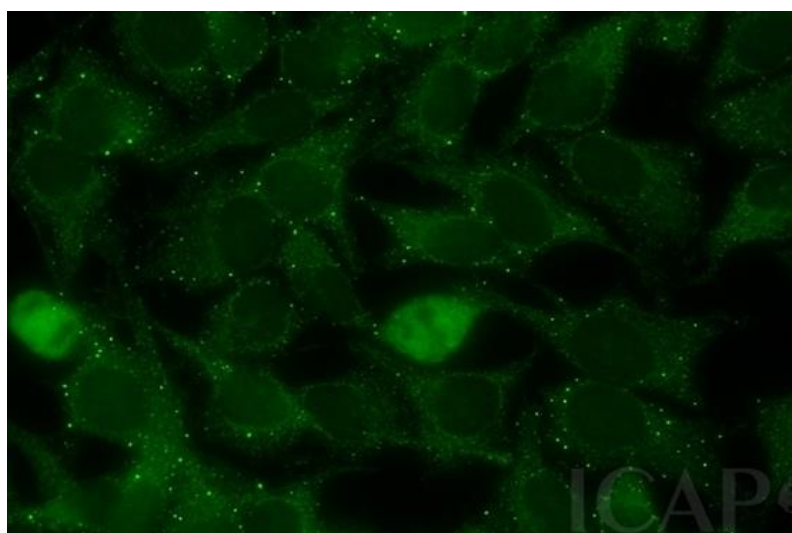


Figura 26: Padrão Citoplasmático Granular (Grânulos Isolados) (AC-18). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Citoplasmático Granular Fino Denso (AC-19): padrão caracterizado por fluorescência densa e granular ao longo de todo o citoplasma.³²

Encontrado em pacientes portadores de SLE, Síndrome de Raynaud's e doença pulmonar intersticial. Os antígenos associados a este padrão são: PL-7, PL-12, proteína P ribossomal.³⁰

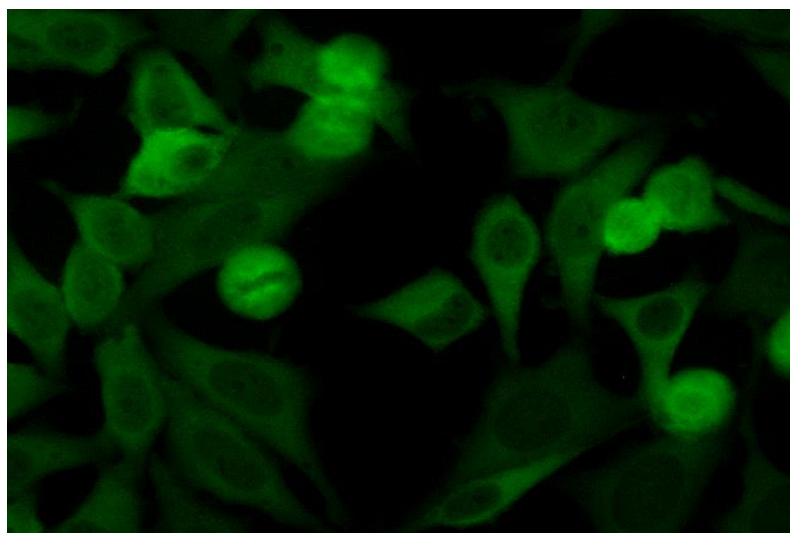


Figura 27: Padrão Citoplasmático Granular Fino Denso (AC-19). Adaptado de: www.anapatterns.org

- Padrão Citoplasmático Granular Fino (AC-20): neste padrão observa-se um pontuado fino disperso ao longo de todo o citoplasma.³²

Encontrado em pacientes com síndrome de anti-sintetase, doença pulmonar intersticial, síndrome de Raynaud, entre outros. Inicialmente, este padrão apenas foi associado ao anticorpo anti-Jo1. Posteriormente, em estudos recentes, este padrão foi associado a outros anticorpos, desde então, sempre que se encontra este padrão recomenda-se a confirmação da presença de anticorpo anti-Jo1 a partir de outros métodos imunoenzimáticos. A distinção entre o AC-19 e o AC-20 depende das células HEp-2 utilizadas e/ou da concentração do anticorpo. Os anticorpos anti-Jo1, podem não ser detetados por este método.³⁰

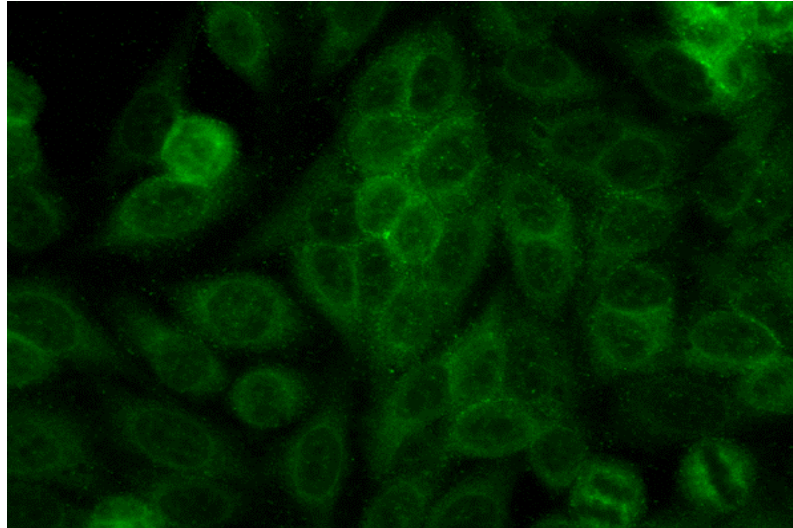


Figura 28: Padrão Citoplasmático Granular Fino (AC-20). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- **Padrão Citoplasmático Reticular (Tipo Mitocondrial) (AC-21):** padrão associado a anticorpos anti-mitocôndria que é definido por uma marcação granular grosseira em todo o citoplasma.³²

O padrão AC-21 está associado aos antígenos BCOADC-E2, PDC-E2/M2, OGDC-E2, E3BP/proteína X e a subunidade E1 da PDC. O padrão AC-21 tem sido observado em pacientes com Esclerose Múltipla e CBP. Embora raramente este padrão também pode estar associado a outras DAI sistêmicas.³⁰

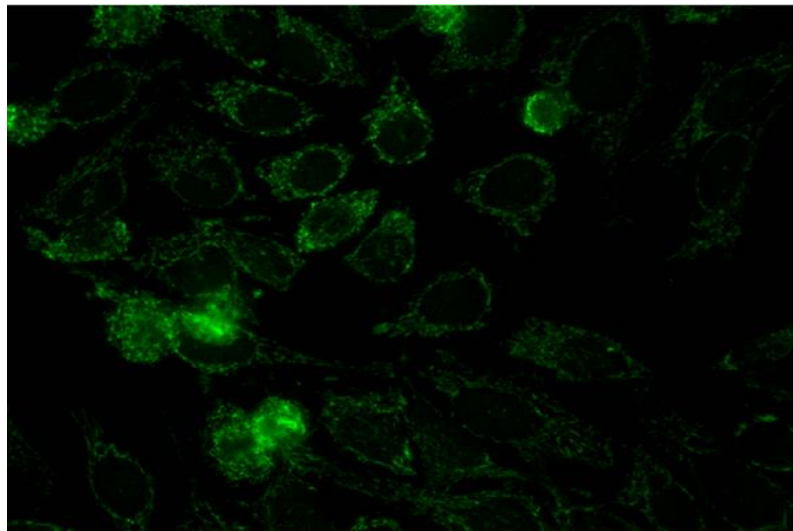


Figura 29: Padrão Citoplasmático Reticular (Tipo Mitocondrial) (AC-21). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

- **Padrão Citoplasmático Granular Polar (tipo Golgi) (AC-22):** padrão definido por um granulado perinuclear descontínuo em todo o citoplasma.³²

Este padrão tem sido associado aos antígenos giantina/macrogolgina, golgina-95/GM130, golgina-160, golgian-97, golgina-245 e tem sido encontrado, embora com pouca frequência, em pacientes com SS, LES, AR, infecções virais, entre outros.³⁰

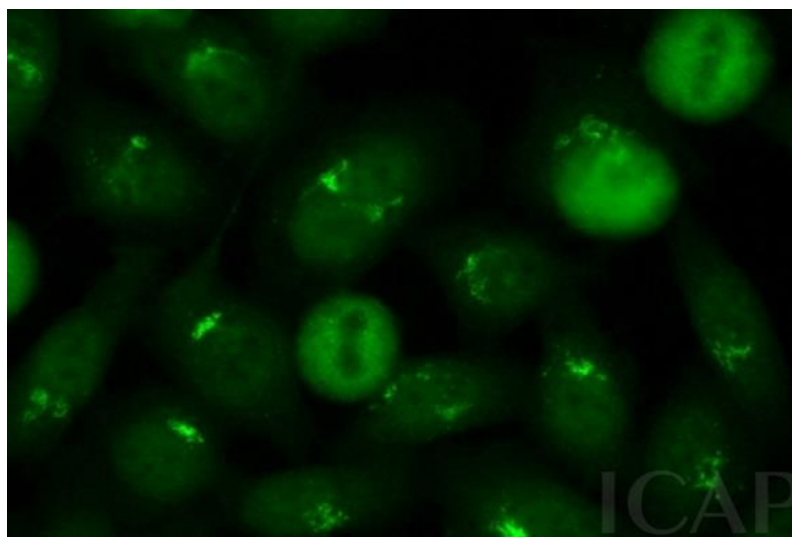


Figura 30: Padrão Citoplasmático Granular Polar (Tipo Golgi) (AC-22). Adaptado de: www.anapatterns.org

- **Padrão Citoplasmático Anéis e Bastonetes (AC-23):** este padrão exibe estruturas parecidas com anéis e bastonetes no citoplasma de células em interfase. Estas estruturas também podem ser observadas em menos quantidade no núcleo das células.³²

Este padrão está associado ao antígeno IMPDH2 e pode ser encontrado em doentes com HCV após tratamento com IFN/ribavirina. Embora raro, também pode ser encontrado em pacientes com LES e doença de Hashimoto.³⁰

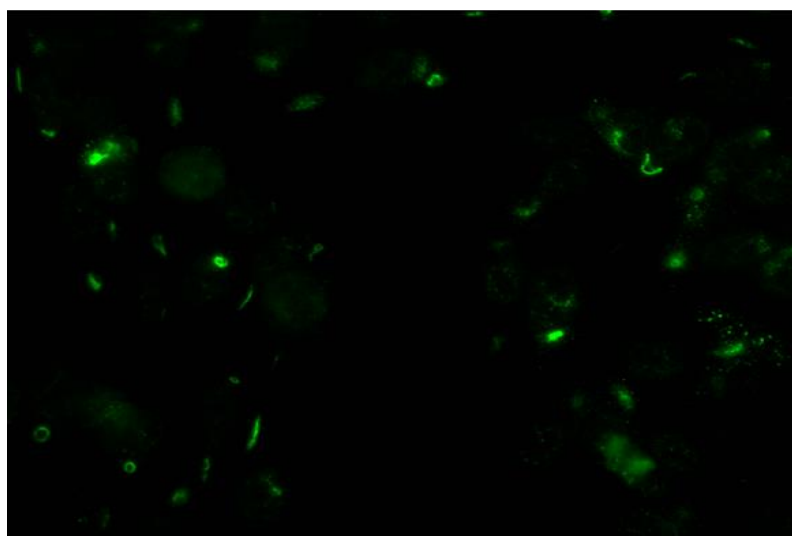


Figura 31: Padrão Citoplasmático Anéis e Bastonetes (AC-23). Fonte: Serviço de Imunologia do CHUP

Mitóticos

Os padrões mitóticos representam um total de 5 padrões já descritos (AC-24 a AC-28).³

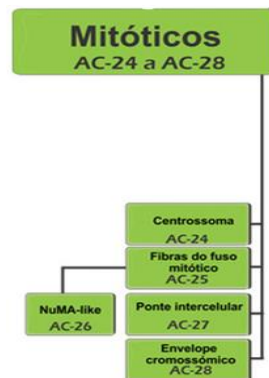


Figura 32: Algoritmo de classificação dos padrões mitóticos. Adaptado de: www.anapatterns.org

Assim, os padrões mitóticos são:

- **Padrão Centrossoma** (AC-24): neste padrão, existe uma marcação dos centríolos (1 a 2 por células) nos polos do fuso mitótico em células em mitose.³²

O padrão Centrossoma tem sido associado aos antígenos Pericentrina, Nineína, cCep2250, Cep110 e observado em pacientes com Esclerose Múltipla, Síndrome de Raynaud e infecções virais.³⁰

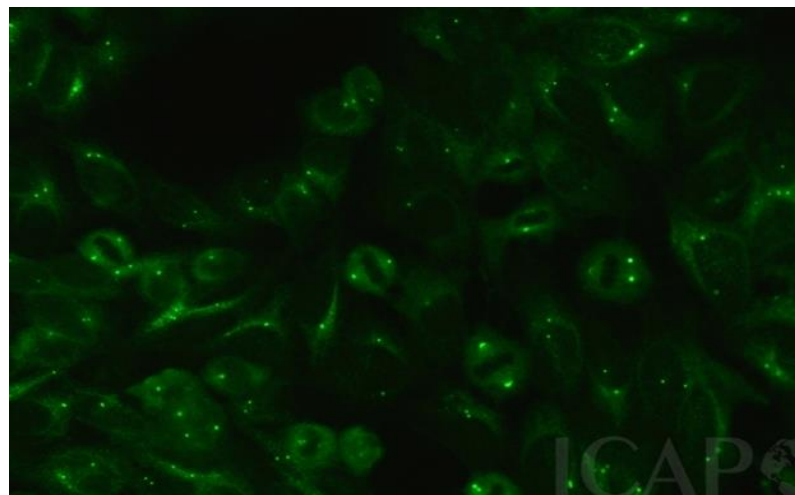


Figura 33: Padrão Centrossoma (AC-24). Adaptado de: www.anapatterns.org

- **Padrão Fuso Mitótico** (AC-25): observa-se uma fluorescência das células mitóticas na região do cone do fuso mitótico.³²

O padrão AC-25 é encontrado muito raramente em contexto clínico, apresentando um baixo valor preditivo para qualquer doença. O antígeno mais associado a este padrão é o HsEg5. Atualmente não se encontra disponível no mercado um kit de detecção para este antígeno.³⁰

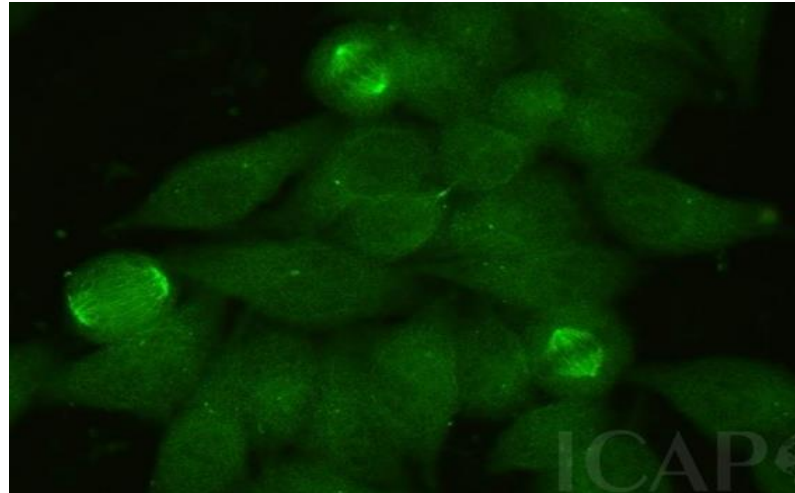


Figura 34: Padrão Fuso Mitótico (AC-25). Adaptado de: www.anapatterns.org

- **Padrão Fuso Mitótico (NuMA-1) (AC-26):** observa-se uma coloração nuclear com o padrão mosqueado fino e marcação do fuso mitótico.³²

O padrão NuMA-1 está associado aos antígenos NuMA e Centrophilina e pode ser observado com frequência em pacientes com LES e SS.³⁰

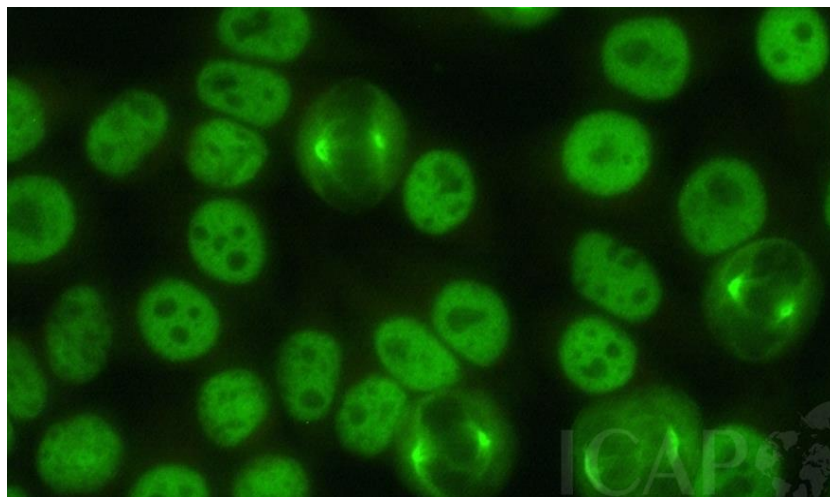


Figura 35: Padrão Fuso Mitótico (NuMA-1) (AC-26). Adaptado de: www.anapatterns.org

- **Padrão Ponte Intercelular (AC-27):** este padrão exibe uma marcação do corpo intercelular que garante a ligação entre as 2 células recém formadas nos processos de mitose celular.³²

Apesar de ainda não existirem estudos que refiram com certeza a associação deste padrão com um antígeno em concreto, este tem sido observado, embora raramente, em pacientes com Síndrome de Raynaud, Esclerose Múltipla e neoplasias.³⁰

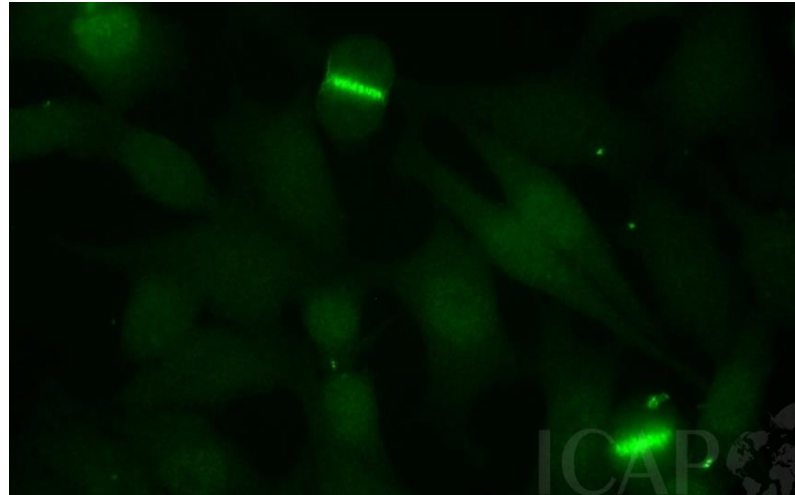


Figura 36: Padrão Ponte Intercelular (AC-27). Adaptado de: www.anapatterns.org

- **Padrão Envelope Cromossômico AC-28:** neste padrão observa-se uma coloração do tipo granular nos cromossomas das células em metáfase e prometáfase, não existindo fluorescência em células em interfase.³²

Este padrão está associado aos antígenos histona modificada H3, MCA-1 e tem sido reportado em doentes com LED (Lúpus Eritematoso Discoide), Polimialgia Reumática, Leucemia Linfocítica Crónica (LLC) e SS, embora de forma rara em todas estas patologias.³⁰

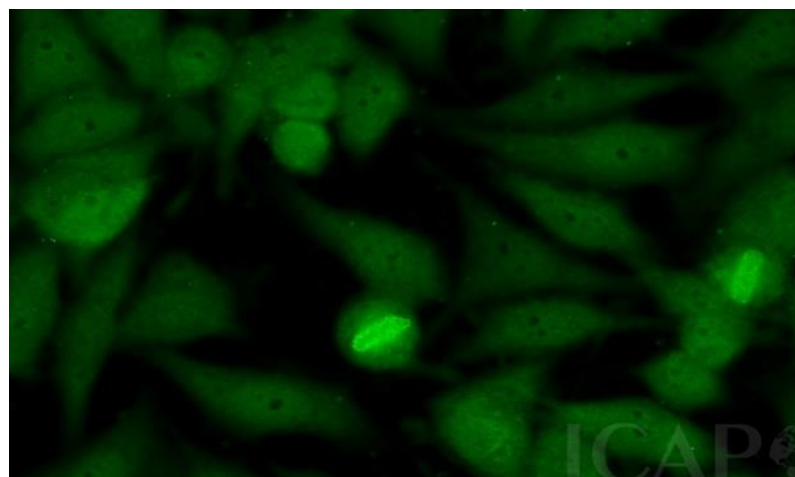


Figura 37: Padrão Envelope Cromossômico (AC-28). Adaptado de: www.anapatterns.org

Prosseguimento do estudo analítico

Embora o método de IFI seja o método *gold standard* para a pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, este método tem como limitação a impossibilidade de, apenas visualizando o padrão de fluorescência não se conseguir identificar qual o autoanticorpo presente na amostra. Devido a esta limitação, depois de observado um resultado positivo nas células HEp-2, é realizada, em função do padrão a pesquisa do autoanticorpo específico, recorrendo a outros métodos laboratoriais disponíveis neste serviço. Assim, o método de IFI em células HEp-2 funciona como um guia que orienta os profissionais deste laboratório na escolha do melhor método presente neste serviço para o prosseguimento do estudo analítico com vista à correta identificação do autoanticorpo presente na amostra.

Na secção de autoimunidade do serviço de imunologia do CHUP são usados no prosseguimento do estudo analítico os métodos de IB, ELISA, FEIA e a CLIA.

Normas ICAP para reportar resultados

No consenso internacional ICAP, a par da criação dos padrões, foram também criadas recomendações para a reportar os resultados aos clínicos. Assim, o ICAP recomenda que no boletim de resultados esteja presente:⁴

- O tipo de método realizado (IFI em células HEp-2);
- O resultado da seguinte forma: positivo/negativo; padrão observado e título (no caso de ser positivo);
- Comentário (caso seja relevante);
- No caso de haver mais do que um padrão observado:
 - Se os padrões observados não forem do mesmo grupo: a sequência deve ser, independentemente do título: nuclear-citoplasmático-mitótico;
 - Se os padrões observados forem do mesmo grupo: a sequência deve ser do padrão com título mais elevado para o padrão com título menos elevado;

Quanto ao modo de como os padrões citoplasmáticos e mitóticos são reportados, não existe um consenso sobre se, caso numa amostra apenas se encontrem padrões destes dois grupos, se deve considerar ANA positivo ou ANA negativo. Trabalhos realizados paralelamente ao ICAP, como o consenso brasileiro e o fórum italiano *Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni* (FIRMA), defendem que se deve reportar a existência de anticorpos citoplasmáticos e mitóticos como ANA positivo. Estes consensos entendem que o termo ANA deve abranger todos os anticorpos que tenham afinidade para qualquer estrutura celular, logo também engloba os anticorpos citoplasmáticos e mitóticos. Por sua vez, o *European Consensus Finding Study Group on Laboratory Investigation in Rheumatology* defende que os padrões citoplasmáticos e mitóticos devem ser reportados como ANA negativo. Por fim, o *American College of Rheumatology* (ACR) e a *International Union of Immunological Societies* IUIS não indicam uma posição clara sobre este assunto, referindo apenas que os padrões citoplasmáticos e mitóticos devem ser reportados sempre que possível.⁴ Na figura 36, estão exemplificados quatro exemplos de resultados possíveis reportados das duas formas em discussão. Na coluna “Proposal 1” os padrões citoplasmáticos e mitóticos são

reportados como ANA positivo, ao passo que, na coluna “Proposal 2” os padrões citoplasmáticos e mitóticos são reportados como ANA negativo.

<i>Proposal 1: cytoplasmic & mitotic patterns considered ANA positive</i>	<i>Proposal 2: cytoplasmic & mitotic patterns considered ANA negative</i>
Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Negative Advice: -	Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Negative Advice: -
Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Positive, cytoplasmic speckled, 1:80 Advice: In case of suspicion of myositis, consider further testing for anti-synthetases, e.g. Jo-1	Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Negative, cytoplasmic speckled, 1:80 Advice: In case of suspicion of myositis, consider further testing for anti-synthetases, e.g. Jo-1
Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Positive, nuclear speckled, 1:160 and cytoplasmic reticular/AMA, 1:1280 Advice: In case of suspicion of autoimmune liver disease, consider confirmation of anti-mitochondrial antibodies	Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Positive, nuclear speckled, 1:160 and cytoplasmic reticular/AMA, 1:1280 Advice: In case of suspicion of autoimmune liver disease, consider confirmation of anti-mitochondrial antibodies
Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Positive, centromere, 1:1280 and nuclear homogeneous, 1:80 Advice: In case of suspicion of systemic sclerosis, consider confirmation of anti-CENP-B antibodies	Assay: ANA on HEp-2 cells Result: Positive, centromere, 1:1280 and nuclear homogeneous, 1:80 Advice: In case of suspicion of systemic sclerosis, consider confirmation of anti-CENP-B antibodies

Figura 38: Quatro resultados possíveis reportados à luz das duas propostas em discussão.

Como o SI reporta os resultados

O serviço de Imunologia do CHUP adotou a seguinte estratégia na divulgação dos resultados:

- Separar os padrões por grupo em alíneas diferentes (nucleares- citoplasmáticos- mitóticos) com indicação para cada um se é negativo ou positivo;
- Apenas se reporta o título quando existe padrões nucleares;

As figuras abaixo exemplificam a forma como o Serviço de Imunologia do CHUP está a reportar os resultados aos clínicos.

Relatório Final	Resultado / Unidades	Valores de Referência	Histórico
AUTO-ANTICORPOS			
Anti-nucleares e citoplasmáticos (IFI em células HEP-2)	Negativo (AC-0)		
Anti-Mitocondria (IF)	Negativo	< 1/160	
Anti-Antígenos Hepáticos (IB)			
Ro 52	Negativo		
SLA/LP	Negativo		
LC1	Negativo		
LKM1	Negativo		
gp210	Negativo		
PML	Negativo		
Sp100	Negativo		
M2-3E (BPO)	Negativo		
M2	Negativo		
Anti-LKM	Negativo	<1/20	
Anti-Musculo Liso	1/160	< 1/40	
Anti-Actina F	18,3 U/mL	< 20,0	
Anti-Citoplasma dos Neutrófilos (ANCA)	Negativo	< 1/20	

Figura 39: Relatório de paciente do sexo masculino de 61 anos.

No relatório acima ilustrado, o resultado é negativo para anticorpos nucleares, citoplasmáticos e mitóticos.

AUTO-ANTICORPOS			
Anti-nucleares e citoplasmáticos (IFI em células HEP-2)			
Padrão nuclear	Nuclear mosqueado (AC-2, 4, 5, 29)		1/1280
Título	1/1280	< 1/160	Negativo
Padrão citoplasmático	Negativo		Negativo
Padrão mitótico	Negativo		

Figura 40: Relatório de paciente do sexo masculino de 44 anos.

Neste relatório, é reportada a observação do padrão Nuclear Mosqueado com o título de 1/1280. Como não foram testadas as especificidades, não se especifica o anticorpo presente na amostra nem o tipo de padrão mosqueado observado.

AUTO-ANTICORPOS				
Anti-nucleares e citoplasmáticos (IFI em células HEP-2)				
Padrão nuclear	Nucleolar (AC-8, 9, 10) Nuclear mosqueado (AC-2, 4, 5, 29)		+	
Título	1/320	< 1/80	1/160	1/320
Padrão citoplasmático	Negativo			
Padrão mitótico	Negativo			
Anti-dsDNA (FEIA)	0,6 U/mL	< 15,0	0,5	0,6
Anti-Sm	1,3 U/mL	< 10,0	1,0	0,4
Anti-U1 RNP	1,2 U/mL	< 10	0,8	0,6
Anti-SS-A	0,3 U/mL	< 10,0	0,1	0,1
Anti-SS-B	0,3 U/mL	< 10,0	0,1	0,1
IgG anti-Cardiolipina (QL)	5,3 UQ	< 20	6,8	< 2,6
		95UQ equivalente a 40GPL		
IgM anti-Cardiolipina (QL)	< 1,0 UQ	< 20	< 1,0	< 1,0
		31UQ equivalente a 40MPL		

Figura 41: Relatório de paciente do sexo feminino de 14 anos.

No exemplo acima ilustrado, é reportada a observação de dois padrões nucleares com título 1/320: Nucleolar e Mosqueado. Não foi possível identificar o respectivo AC, uma vez que as especificidades testadas originaram resultados negativos.

AUTO-ANTICORPOS				
Anti-nucleares e citoplasmáticos (IFI em células HEP-2)				
Padrão nuclear	Negativo			
Título	Negativo	< 1/160		
Padrão citoplasmático	Citoplasmático reticular(tipo Mitochondrial)(AC-21)		+	
Padrão mitótico	Negativo			
Anti-dsDNA (FEIA)	29,0 U/mL	< 15,0	45,0	26,0
Anti-Mitocondria (IF)	1/1280	< 1/160	1/1280	1/1280
Anti-M2 mitocondrial (ELISA)	> 200 U/mL	< 20		
IgG anti-Cardiolipina (QL)	21,6 UQ	< 20	29,4	14,9
		95UQ equivalente a 40GPL		
IgM anti-Cardiolipina (QL)	3,4 UQ	< 20	5,2	2,4
		31UQ equivalente a 40MPL		

Figura 42: Relatório de paciente do sexo feminino de 48 anos.

No exemplo acima ilustrado, é reportada a observação do padrão citoplasmático reticular (Tipo Mitochondrial) (AC-21). A identificação dos anticorpos anti-M2 por ELISA foi positiva.

AUTO-ANTICORPOS

Factor Reumatóide	10,9 U/mL	< 14	<20
Anti-nucleares e citoplasmáticos (IFI em células HEP-2)			
Padrão nuclear	Centrómero (AC-3)		
Título	1/1280	< 1/160	>1/1280 >1/2560
Padrão citoplasmático	Citoplasmático reticular(tipo Mitochondrial)(AC-21)		
Padrão mitótico	Negativo		
Anti-SS-A	0,7 U/mL	< 10,0	
Anti-SS-B	0,1 U/mL	< 10,0	
Anti-Centrómero	168,0 U/mL	< 10	
Anti-alfa-fodrina	4,0 U/mL	< 24	
Anti-M2 mitocondrial (ELISA)	> 200 U/mL	< 20	52,0
Anti-Antígenos Hepáticos (IB)			
Ro 52	Fracamente positivo		
SLA/LP	Negativo		
LC1	Negativo		
LKM1	Negativo		
gp210	Negativo		
PML	Negativo		
Sp100	Negativo		
M2-3E (BPO)	Positivo		
M2	Positivo		

Figura 43: Relatório de paciente do sexo feminino de 60 anos.

No relatório acima ilustrado, são reportados dois padrões: o padrão Nuclear Centrómero (AC-3) com título 1/1280 e o padrão Citoplasmático Reticular (Tipo Mitochondrial) (AC-21). Os testes para a identificação dos anticorpos anti-centrómero, anti-M2 e anti-M2-3E deram resultado positivo.

AUTO-ANTICORPOS

Anti-nucleares e citoplasmáticos (IFI em células HEP-2)			
Padrão nuclear	Nuclear mosqueado (AC-2, 4, 5, 29)		
Título	1/640	< 1/160	
Padrão citoplasmático	Negativo		
Padrão mitótico	Fuso mitótico (NuMA-1) (AC-26)		

Figura 44: Relatório de paciente do sexo masculino de 69 anos.

Neste relatório, foi reportado a observação do padrão nuclear mosqueado com título de 1/640 e do mitótico Fuso Mitótico (NuMA-1) (AC-26).

Conclusão

A experiência resultante da crescente utilização da nomenclatura ICAP, quer em contexto laboratorial quer em contexto de literatura científica, tem originado nos últimos anos revisões sistemáticas à nomenclatura com vista ao aperfeiçoamento e harmonização da mesma. Por ainda haver questões em que a comunidade científica não está totalmente de acordo, é de esperar no futuro que o consenso seja baseado apenas em opiniões de especialistas e surjam mais revisões a esta nomenclatura.

A divulgação na classe médica da nomenclatura ICAP, das suas evoluções, da relevância clínica de cada padrão, assim como, a maneira como o laboratório reporta os resultados obtidos, é fundamental para a correta interpretação dos resultados. Mais do que reportar um padrão observado, é importante descobrir qual o anticorpo presente na amostra, pois será isso que fará a diferença no diagnóstico/tratamento de doenças autoimunes reumáticas sistémicas.

Bibliografia

1. Luiz P, Francescantonio C, Cruvinel WDM, Dellavance A, Andrade L E, von Mühlen, Carlos Alberto. IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2. *Rev Bras Reumatol*. 2014;54(1):44-50.
2. Silva GG, Gomes CM, Dellavance A, Francescantonio PLC, Andrade LEC, Cruvinel WM. Implementation of the ANA HEP-2 consensus guidelines in Brazilian clinical laboratories. *J Bras Patol e Med Lab*. 2017;53(6):368-376. doi:10.5935/1676-2444.20170059
3. Chan EKL, Damoiseaux J, De Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio P, Fritzler MJ. Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Sage pub*. 2016;25(8):797-804. doi:10.1177/0961203316640920
4. Jan Damoiseaux, Muhlen, Carlos A. von Torre IG-D La. International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Autoimmun Highlights*. 2016;(Immunology):1-8. doi:10.1007/s13317-016-0075-0
5. Herold M, Klotz W, Andrade LEC, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Damoiseaux J, Fritzler MJ, von Muhlen CA. International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns : defining negative results and reporting unidentified patterns. *Clin Chem Lab Med*. 2018;(Autoimmunity):1-3 doi:10.1515/cclm-2018-0052
6. Chan EKL, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, Fritzler MJ, Garcia-De La Torre I, Herold M. Report of the First International Consensus on Standardized Nomenclature of Antinuclear Antibody HEP-2 Cell Patterns (ICAP). *Front Immunol*. 2015;6(Immunology):1-13. doi:10.3389/fimmu.2015.00412
7. Andrade LEC, Klotz W, Herold M, Conrad K, Rönnelid J, Fritzler MJ, von Mühlen CA, Satoh M, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W. International consensus on antinuclear antibody patterns : definition of the AC-29 pattern associated with antibodies to DNA topoisomerase I. *Clin Chem Lab Med*. 2018; 56(10): 1-3 doi: 10.1515/cclm-2018-0188.
8. Garcez D. *O papel da nutrição nas doenças autoimunes* [Tese de Mestrado]. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; 2014: 7-8.

9. Augusto R, Braga J. *Influência do género desenvolvimento de doenças autoimunes* [Tese de Mestrado]. Porto. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar; 2014: 23-24
10. Carvalheiro HM. *The role of CD8 T cells in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis* [Tese de doutoramento]. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2014: 13-14
11. Costa MG. *Serviço de Patologia Clínica Hospitais da Universidade de Coimbra* [Tese de Mestrado]. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2012: 17-18.
12. Chan EKL, Toubi E, Conrad K, Chan EKL. Biomarkers and Pathogenic Mechanisms in Autoimmunity. *Immunol Res.* 2017; 65(1): 296-298. doi:10.1007/s12026-016-8864-0
13. José X. *Rastreio combinado do 1º trimestre e doenças autoimunes* [Tese de Doutoramento]. Lisboa: Faculdade de Medicina da Universidade Nova de Lisboa; 2014: 9-18.
14. Peixoto A. *Diabetes Mellitus Tipo 1: associação de doenças autoimunes* [Tese de Mestrado]. Coimbra: Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra; 2014: 9-10 doi:10.1038/nrg3575.Systems
15. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: A comprehensive update. *J Intern Med.* 2015; 278(4): 369-395. doi:10.1111/joim.12395
16. Quintero OL, Amador-Patarroyo MJ. Autoimmune disease and gender: Plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. *J Autoimmun.* 2012; 38: 109-119.
17. ToreJørgensen K, Pedersen BV. Childbirths and risk of female predominant and other autoimmune diseases in a population-based Danish cohort. *J Autoimmun.* 2012; 38: 81-87.
18. Copple SS, Jaskowski TD, Giles R, Hill HR. Interpretation of ANA indirect immunofluorescence test outside the darkroom using NOVA view compared to manual microscopy. *J Immunol Res.* 2014; 2014:8-14. doi:10.1155/2014/149316
19. Ricchiuti V, Adams J, Hardy DJ, Katayev A, Fleming JK. Automated processing and evaluation of anti-nuclear antibody indirect immunofluorescence testing. *Front Immunol.* 2018; 9(Autoimmunity): 1-11. doi:10.3389/fimmu.2018.00927

20. Francescantonio PLC, Andrade LEC, Cruvinel WDM, Ikeda e Araujo F, Dellavance A, Junior AG, Nuccitelli B, von Mühlen CA, Araújo Bichara CD. III Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em Células HEp-2: perspectiva histórica, controle de qualidade e associações clínicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45(3): 185-199. doi:10.1590/S1676-24442009000300003
21. Bishop LM, Fody E, Schoeff L. *Clinical Chemistry- Techniques, Principles, Correlations*. Vol 53. 6th ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health; 2010: 199-200
22. Munujos P. Autoimmune diagnostics by immuno-fluorescence: variability and harmonization. *Cli*. 2016; November: 38-41.
23. Silva SCJ. *Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas* [Tese de Mestrado]. Coimbra: Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra; 2015: 22.
24. Braga D. *Contagem globular automática: parâmetros avaliados, significado clínico e causas de erro* [Tese de Mestrado]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2014: 16-17.
25. Ramos C. *Evaluation of Bisphenol A Genotoxicity and Interference on Doxorubicin Effects in HEp-2 and MRC-5 Cell Lines* [Tese de Mestrado]. Lisboa: Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2017: 21.
26. Malyavantham K, Suresh L. Analysis of DFS70 pattern and impact on ANA screening using a novel HEp-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. *Autoimmun Highlights*. 2017; 8(1): 1-10. doi:10.1007/s13317-017-0091-8
27. Rocha M. *Determinação de autoanticorpos em doentes com suspeita de hepatite autoimune e cirrose biliar primária* [Tese de Mestrado]. Porto: Escola Superior de Tecnologias da Saúde do Porto; 2012: 40-52 <http://recipp.ipp.pt/handle/10400.22/1112>.
28. Aleixo AC. *Relatório de estágio- Mestrado em Análises Clínicas* [Tese de Mestrado]. Lisboa: Faculdade de Farmácia; 2013: 41-46. <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/11521>.
29. Hira-Kazal R, Shea-Simonds P, Peacock JL, Maher J. How should a district general hospital immunology service screen for anti-nuclear antibodies? An “in-the-field” audit. *Clin Exp Immunol*. 2015; 180(1): 52-57. doi:10.1111/cei.12556
30. Damoiseaux J, Andrade C, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, Fritzler MJ, Garcia de la Torre I, Herold M, Klotz W. Clinical relevance of HEp-2 indirect

- immunofluorescent patterns: the International Consensus on ANA patterns (ICAP) perspective. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2019: 1-6. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214436
31. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoimmunity Reviews Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction , prognosis and prevention. *Autoimmun Rev*. 2015; 14(6): 555-563. doi:10.1016/j.autrev.2015.01.017
 32. ANA Patterns. ICAP (International Consensus on ANA Patterns). <https://www.anapatterns.org/>. Online desde 19 de maio de 2015. Consultado a: 20 de setembro de 2019 Published 2019.
 33. Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. *Autoimmun Highlights*. 2016; 7(1): 1-4. doi:10.1007/s13317-016-0081-2